

---

**ATTIVITÀ ANTIBATTERICA DI  
MOLECOLE NATURALI E DI SINTESI  
SULLA FLORA MICROBICA  
RISCONTRABILE NEGLI ALIMENTI**

---

**Mariachiara Conte**

Dottorato in Scienze Biotechnologiche – XIX ciclo  
Indirizzo Biotechnologie Industriali  
Università di Napoli Federico II







---

**ATTIVITÀ ANTIBATTERICA DI  
MOLECOLE NATURALI E DI SINTESI  
SULLA FLORA MICROBICA  
RISCONTRABILE NEGLI ALIMENTI**

---

**Mariachiara Conte**

Dottoranda: Mariachiara Conte

Relatore: Prof.ssa Marina Piscopo

Coordinatore: Prof. Gennaro Marino



*A Mamma e Papà*



## INDICE

<b>RIASSUNTO</b>	pag.	1
<b>SUMMARY</b>	pag.	3
<b>INTRODUZIONE</b>	pag	7
<b>SCOPO DEL LAVORO</b>	pag	23
<b>MATERIALI E METODI</b>	pag	27
<b>RISULTATI</b>		
<b>SAGGI DI ATTIVITA' ANTIBATTERICA</b>		
SAGGIO DI DIFFUSIONE RADIALE IN TERRENO SOLIDO (KIRBY BAUER)	pag	33
SAGGIO DI DILUIZIONI SCALARI IN LIQUIDO	pag	37
SAGGIO DI DILUIZIONI SCALARI IN SOLIDO	pag	37
EFFETTO DEL PH SULL'ATTIVITÀ ANTIBATTERICA	pag	39
EFFETTO DELLA TEMPERATURA SULL'ATTIVITÀ ANTIBATTERICA DI POLY-ARG	pag	42
EFFETTO DELLA GELATINA SULL'ATTIVITÀ ANTIBATTERICA DI POLY-ARG	pag	43
PREPARAZIONE DEL FILTRATO DEGLI ISTONI H1 DEGUANIDINATI	pag	44
CROMATOGRAFIA A FASE INVERSA PER HPLC DEL FILTRATO DERIVATO DA H1 DI C.T. DEGUANIDINATO	pag	44
<b>STUDIO DEL MECCANISMO MOLECOLARE DI AZIONE DELLE MOLECOLE AD ATTIVITÀ ANTIBATTERICA</b>		
REAZIONE DI MARCATURA DI POLY-ARG CON DEAC,SE E PURIFICAZIONE MEDIANTE RP-HPLC	pag	49
MICROSCOPIA A FLUORESCENZA	pag	49
SAGGI EMSA UTILIZZANDO DNA PLASMIDICO E GENOMICO	pag	54
<b>DISCUSSIONI E CONCLUSIONI</b>	pag	67
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	pag	75
<b>PUBBLICAZIONI</b>	pag	80

## RIASSUNTO

Obiettivo di questo lavoro di tesi è stata l'identificazione di nuove molecole con attività antimicrobica ad ampio spettro d'azione sui microrganismi patogeni che contaminano i cibi, allo scopo di utilizzarle come conservanti nei cibi per sostituire i comuni composti chimici ritenuti sempre più spesso dannosi per l'uomo.

La prima fase di questo studio è stata dedicata all'analisi dell'attività antimicrobica su *Bacillus subtilis* di istoni H1 da timo di vitello (C.T.) e da spermi dell'anellide marino *Chaetopterus variopedatus* (Ch.v.), di protammine di Ch.v., di aringa (clupeina solfato) e di salmone (salmina) e polimeri di L-arginina (Poly-Arg) e di L-lisina (Poly-Lys) con peso molecolare di 14000 Da. Tale attività è stata valutata mediante saggi di diffusione radiale in terreno solido (Kirby-Bauer) e tutte le molecole eccetto l'istone H1 di C.T. hanno mostrato attività con diversa efficienza.

Sono state effettuate modifiche chimiche a carico di residui di arginina, per deguanidinazione, di entrambi gli istoni H1 e della protammina di Ch.v. e della clupeina; e modifiche a carico dei residui di lisina, per acetilazione e succinilazione, della protammina di Ch.v. per verificarne l'influenza sull'attività antibatterica. Le analisi hanno indicato che tutte le molecole deguanidinate sono più efficienti delle molecole native mentre sia il derivato acetilato che il succinilato della protammina di Ch.v. hanno mostrato attività antibatterica paragonabile alla molecola nativa.

Poiché la deguanidinazione in genere causa parziale frammentazione della molecola si è cercato di isolare i frammenti eventualmente derivati dalle molecole modificate. Gli istoni H1 deguanidinati sono stati filtrati su filtri Millipore (cut off 3000 Da) e la frazione trattenuta dal filtro e quella filtrata sono state saggiate su *B. subtilis* mediante saggi Kirby Bauer. L'attività antibatterica è stata riscontrata solo nel filtrato ed i pattern elettroforetici in SDS della frazione attiva hanno evidenziato in entrambi i casi la presenza di peptidi che potrebbero essere responsabili dell'attività antibatterica.

Allo scopo di identificare un possibile peptide attivo il filtrato derivato dall'istone H1 di C.T. deguanidinato è stato separato mediante cromatografia a fase inversa per HPLC (RP-HPLC), da cui sono risultati cinque picchi che sono stati saggiati su *B. cereus*; solo due picchi, con tempi di ritenzione più bassi, hanno mostrato attività antibatterica.

L'attività antibatterica delle molecole prese in esame in questo lavoro di tesi è stata valutata sui più comuni batteri patogeni che contaminano i cibi (*Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella thyphimurium*, *Shigella sonnei* e *Pseudomonas aeruginosa*). I parametri scelti per valutare l'attività antibatterica sono stati la Concentrazione Minima Inibente (MIC) e la Concentrazione Minima Battericida (MBC) definite, rispettivamente, come la minima concentrazione di agente antimicrobico in cui non vi è crescita batterica visibile come torbidità della coltura batterica, e quella alla quale la crescita è totalmente assente su terreno solido dopo aver allontanato l'agente antimicrobico. Tali saggi hanno evidenziato per le molecole un'attività batteriostatica e battericida con valori di MIC ed MBC che variano da 2 a 0,007 mg/ml. E' stata analizzata inoltre l'influenza del pH sui valori di MBC di salmina e salmina solfato su ciascun ceppo ed entrambe le molecole sulla maggior parte dei ceppi, conservano l'attività antibatterica da pH 4 a 8, con un optimum di attività tra 7 e 8.

L'effetto della temperatura sull'attività antibatterica è stata valutata su poly-Arg che in seguito a trattamento in autoclave per 20 minuti mantiene l'attività sebbene con valori di MBC maggiori di quelli della molecola non sottoposta al calore.



Inoltre la poly-Arg coniugata ad un fluoroforo (DEAC,SE) ed incubata con *E. coli* O157:H7 e *B. cereus* , ha mostrato una distribuzione sulla superficie della cellula batterica ma anche all'interno di essa.

Tutte le molecole che hanno mostrato attività antibatterica hanno evidenziato, mediante saggi di ritardo della mobilità elettroforetica (EMSA) con DNA plasmidico, affinità per il DNA, supportando l'ipotesi che quest'ultimo possa essere il loro target. Inoltre le molecole che hanno mostrato una maggiore attività antibatterica sono anche quelle che hanno presentato una maggiore cooperatività nel legare il DNA.

## SUMMARY

Microrganisms are very important for our feeding because they contribute to the production and improvement of a great number of foods like cheese, butter, cream, yogurt and alcoholic drinks. The presence of microrganisms in the foods is not always a positive factor. An uncontrolled and undesired microbial growth can destroy large amounts of food causing economic damages and conspicuous loss of nutritional substances. Moreover, food contaminated by microrganisms or microbial toxins can also cause food infections or poisonings. The most frequent contaminating agents are the bacteria belonging to genera *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Bacillus*, *Listeria* and fungi belonging to genera *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Candida*. At the moment there are many methods to preserve foods like sterilization, freezing, pasteurization, irradiation and additives use.

The increasing trend to limit the use of chemical food preservatives and the increase of bacterial resistance to many classes of antibiotics have generated considerable interest in the use of 'natural' alternatives. In the last few years many reports have been published on the occurrence and characterization of low-molecular-mass antimicrobial peptides from a wide variety of organisms. Many organisms produce arginine- and lysine-rich polycationic peptides to protect themselves from pathogenic microbes. It has been well established that nisin,  $\epsilon$ -poly-L-lysine from bacteria,  $\epsilon$ -poly-L-lysine- like peptides from fungi, and defensins from higher animals and plants exhibit antimicrobial activity. It has been showed that human antimicrobial peptides  $\alpha$ -defensin and LL-37 bind to glycosaminoglycans (heparin and dermatan sulphate) and that structural motifs associated with heparin affinity (cationicity, amphipaticity, and consensus regions) may confer antimicrobial properties to a given peptide.

Among the molecules that are commercially used to control pathogens in foods, there are some antimicrobial proteins, mainly cationic, produced by Gram<sup>+</sup> bacteria, as nisin produced by lactic acid bacteria and  $\epsilon$ -lysine polymers industrially produced in Japan by fermentation process using *Streptomyces albulus*.

Antimicrobial peptides have been also obtained by proteolytic digests of some proteins, like ovalbumine, that do not have antimicrobial activity themselves. It has been postulated that the charge of the molecules may play an important role in their activity. At the moment it is not clear if these antibacterial molecules act inside the bacterial cell or at level of the membrane. Recent studies have indicated that all antimicrobial peptides interact with membranes and then peptides have been classified into two classes on the basis on the possible mechanism of action, membrane disruptive and non-membrane disruptive. An alternative perspective is that the cationic antimicrobial peptides have multiple actions on the cells ranging from membrane permeabilization to cell wall and division effects, to macromolecular synthesis inhibition.

Preliminary data have shown an antimicrobial activity also for some protamines and histones and for their peptides. Some protamines have antimicrobial activity against a wide range of Gram<sup>+</sup> and Gram<sup>-</sup> bacteria, yeasts and moulds and are currently used as preservatives in starch-based foods in Japan. The molecular mechanisms of histones and protamines antimicrobial activities are not yet clear.

The aim of this research project is the identification of model molecules, some natural, with antimicrobial activity against pathogenic agents contaminating foods. First of all preliminary data present in literature has been verified and then new molecules with similar features has been tested. Protamines from salmon (salmine),

herring (clupeine) and from the marine worm *Chaetopterus variopedatus* (*Ch.v.*) sperm, H1 histones from calf thymus (C.T.) and *Ch.v.* sperm, lysine and arginine polymers (poly-Lys and poly-Arg) with molecular weight of 14000 Da, have been tested on very sensitive bacteria *Bacillus subtilis*.

Antimicrobial activity was evaluated on the basis of growth inhibitory halo by radial diffusion assay (Kirby-Bauer) using from 3 ng to 200 µg of each molecule. Salmine sulphate and poly-Lys have shown antibacterial activity at 10 µg, poly-Arg at 20 µg; while *Ch.v* H1 histone, *Ch.v* protamine and clupeine sulphate have shown activity at 50 µg. C.T. H1 histone appeared to have no activity.

It is reported that lysine and arginine residues are critical for antimicrobial activity; then chemical modifications have been performed on these residues for both *Ch.v* H1 histones, protamine and clupeine to verify their influence on antimicrobial activity. All molecules have been modified by deguanidination with hydrazine hydrate, to convert arginine into ornithine; *Ch.v.* protamine has been modified also on lysine by succinylation and acetylation. Deguanidinated *Ch.v.* protamine showed antibacterial activity at 10 µg resulting more efficient than native molecule while acetylated and succinylated derivatives have shown antibacterial activity similar to native molecule. Deguanidinated C.T. and *Ch.v.* H1 histones showed activity at 50 µg; clupeine have maintained the same activity of native molecules but showing a major growth inhibition halo. Deguanidinated clupeine appeared more efficient than deguanidinated H1 histones because it shows a major inhibition halo.

For those molecules which showed antimicrobial activity, Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) were evaluated. The former is defined as the minimum concentration of the molecule at which culture growth does not occur and the latter as the lowest concentration of the molecule resulting in no growth after plating on non-inhibitory solid medium.

To this purpose broth dilution assays were performed with salmine, salmine sulphate, clupeine sulphate, C.T. H1 histone, poly-Lys and poly-Arg on *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella thyphimurium*, *Shigella sonnei* and *Pseudomonas aeruginosa*.

All bacteria strains were inhibited by the tested molecules with different MIC values ranging from 2 to 0,007 mg/ml; the molecules were usually more active on Gram<sup>+</sup> bacteria than Gram<sup>-</sup> strains. Salmine resulted more efficient than salmine sulphate on each bacteria strains except for *L. monocytogenes* on which their activities were similar. Clupeine sulphate showed antibacterial activity similar to salmine sulphate but it revealed more efficient on *B. subtilis*, *L. monocytogenes* and *P. aeruginosa*. Poly-Lys and poly-Arg have different behaviour on various strains. MIC values of salmine resulted almost constant, indicating that this molecule could play its activity against different bacteria at the same concentration.

All molecules showed bactericidal effects with MBC values ranging from 2 to 0,007 mg/ml. Salmine and salmine sulphate showed MBC ranging from 0,125 to 0,75 mg/ml and 0,4 to 2 mg/ml, respectively. Salmine resulted more efficient than salmine sulphate indicating that sulphate groups could neutralize some positive charges reducing antibacterial activity. In fact it has been proposed that the charge of the molecules may play an important role in the antibacterial activity. MBC of clupeine sulphate varied from 0,098 to 1,6 mg/ml. Poly-Lys and poly-Arg showed antibacterial activity ranging from 0,007 to 1 mg/ml and 0,015 to 0,75 mg/ml, respectively; they resulted the most efficient molecules on the majority of tested bacteria strains and resulted more efficient on Gram<sup>+</sup> than Gram<sup>-</sup> bacteria.

These results indicate that proteins and polymers with high content of basic aminoacids have antibacterial activity on pathogenic agents present in foods, in agreement with other data already published. Basic aminoacids could establish electrostatic interactions with the acidic surfaces of the microbial cells probably disrupting the cell membrane and leading to the loss of its main functions. The reduced antibacterial activity observed for salmine sulphate in comparison with salmine could confirm the importance of the positive charges of these molecules for the highest efficiency of the antibacterial activity. Moreover, the MBC values indicate that the molecular weight of the molecules might not be a critical parameter since the tested molecules have similar antimicrobial activity although the molecular weights span from 4000 Da of salmine and clupeine to 14000 Da of poly-Lys and poly-Arg.

The analyses to valuate influence of pH on antimicrobial activity of salmine and salmine sulphate on all bacteria strains showed that both molecules preserve their antimicrobial activity from 4 to 8 pH values, showing an optimum at pH values between 7 and 8 on the majority of bacteria strains. This behaviour may be explained by an increase of negatively charged groups on the cell envelope, which facilitate the electrostatic interactions between the cell envelope and protamine.

In order to analyze the effect of the temperature on the antibacterial activity, the MBC of poly-Arg was measured after autoclaving for 20 minutes. Poly-Arg maintains its antibacterial activity on all bacteria strains after autoclaving although MBC values are higher than those obtained with the corresponding non heated molecule. The MBC value was lower than that of the non heated molecule only on *B. cereus*. This thermal stability suggested that the charge but not the structure of the molecules is important for the antimicrobial activity and supported its use as foods preservative.

It is interesting that deguanidinated C.T. H1 histone showed antibacterial activity absent in native molecule in Kirby Bauer assays. It is possible that the activity is due to some peptides produced by histone fragmentation during the deguanidination reaction.

In fact flowing the deguanidinated C.T. and *Ch.v.* H1 histones through a Millipore filter (cut off 3000) the antibacterial activity was found only in the flow trough.

SDS-PAGE analysis on flow trough have showed peptides with apparent molecular weight of 13000 Da, probably due to polymerization reaction. These polymers or others peptides with molecular weight lower then 3000 Da but present in very low amount, could be responsible of the antibacterial activity.

In order to identify an active peptide, the flow trough of the deguanidinated C.T. H1 histone has been fractionated by Reverse Phase HPLC (RP-HPLC). Elution profile has showed five peaks that have been assayed in broth and solid dilution experiments on *B. cereus*. Only molecules eluted in the two peaks with lowest retention time have antibacterial activity but further experiments have to be performed in order to characterize the active peptides.

The identification of these molecules would confirm recent data present in literature on antimicrobial peptides derived by histones degradation of various origins: oncorhyncin II from the skin secretions of rainbow trout and hipposin from the skin mucus of Atlantic halibut, derived from H1 histone and H2A histone, respectively. Recently it has been reported that chicken H1 and H2B histones from reproductive tissues are active against both Gram<sup>+</sup> and Gram<sup>-</sup> bacteria probably playing an important role in innate immunity.

To investigate if the antimicrobial molecules enter inside the cells, *B. cereus* and *E. coli* O157:H7 were incubated in presence of fluorescence-labeled poly-Arg with DEAC,SE and signals were detected by fluorescence microscope. Fluorescent

images show an homogeneous distribution of fluorescence on the cell surface; the molecules are also inside the cell because the images appeared similar to those obtained using the 4', 6-diamino-2-phenylindole (DAPI) on the same bacteria. In fact it is well known that the DAPI molecules enter cells and bind DNA. These results are in agreement with some authors that demonstrated that polymers of L- or D- arginine are able to penetrate in human T-cell line better than lysine or histidine polymers, because the guanidinium head group could promote cellular uptake more efficient than other positively charged aminoacid side chains. Moreover recently it has been showed that some Arg-rich peptides with antimicrobial activity can entry into the cytoplasm of bacteria cells.

These results suggest that poly-Arg could play its role interacting with some component inside the cell and affecting process like DNA replication, transcription and proteins synthesis. Since all the tested antibacterial molecules are highly basic as poly-Arg and compact DNA (histones and protamines) it's likely to suppose that the DNA is their target.

The laboratory, where this project has been carried on, is studying the different modes of interaction of sperm and somatic H1 histones with DNA. This difference could be due to different arginine and lysine content.

It has been demonstrated, by Electrophoresis Mobility Shift Assay (EMSA), that using the sperm H1 histones, the mobility of DNA is the same as that of naked DNA until H1 histone/DNA percent ratio (w/w) 30; at higher H1/DNA ratios a second lower mobility DNA band is observed close to the starting position while the band corresponding to naked DNA gradually vanishes. In contrast, somatic histones cause a decreased mobility of the DNA band already at H1 histone/DNA percent ratio (w/w) 10, so that the band corresponding to naked DNA is shifted to positions of gradually lower mobility at increasing H1/DNA ratios.

In this thesis work EMSA have been performed on linear plasmid in presence of increasing amounts of antibacterial molecules to verify which kind of interaction with DNA occurred. Each molecules bind to DNA in a similar mode to sperm H1 histone but with different efficiency. Deguanidinated molecules have instead a mode of interaction similar to somatic H1 histone probably due to reduct arginine content.

These results agree with data present in literature where it has been proposed that the guanidinium group of arginine has major efficiency in the binding to DNA than the amino group of lysine. Acetylated and succinylated molecules showed a minor efficiency of binding DNA probably for positive charge decrease. EMSA have been performed also with genomic DNA from *E.coli* in presence of increasing amounts of poly-Arg and C.T. H1 histone and their modes of interaction with DNA resulted similar to that observed with plasmid DNA. EMSA showed that these molecules bind DNA that could be the target of their activity *in vivo* and the molecules with high antibacterial activity are also those that have shown high DNA binding cooperativity.

It would be interesting to elucidate the molecular mechanisms underlying the activity of these molecules to use them as safe preservatives in foods.

## INTRODUZIONE

La produzione di alimenti in grado di soddisfare l'esigenza dei consumatori è una necessità primaria per le industrie alimentari in quanto da essa dipende non solo l'economia del paese ma anche la crescita e lo sviluppo della popolazione. Gran parte degli alimenti che l'uomo consuma sono prodotti o migliorati dall'attività di alcuni microrganismi. L'attività dei microrganismi in genere, ma soprattutto di batteri, lieviti e funghi (muffe) ha come conseguenza la trasformazione della materia di cui si nutrono. Questa caratteristica ha portato l'uomo a riconoscere, sfruttare e spesso guidare i processi trasformativi utili nel campo alimentare. I microrganismi "industriali" possono essere considerati degli specialisti metabolici, manipolabili geneticamente, in grado di generare uno o più prodotti con rese molto alte e in colture su larga scala. I prodotti microbici di interesse industriale sono di vario tipo. Questi includono le stesse cellule, per esempio i lieviti coltivati per alimenti, la lievitazione, la produzione di birra e sostanze prodotte dalle cellule. Formaggio, burro, panna e yogurt sono tutti prodotti per fermentazione microbica; i crauti sono un cibo vegetale fermentato, così come i prodotti derivati dalla carne quali le salsicce e patè di fegato si ottengono utilizzando tecniche di fermentazione microbiche. L'aceto di mele si ottiene utilizzando batteri lattici, mentre le bevande alcoliche si ottengono da processi di fermentazione che prevedono l'uso dei lieviti. Tra i prodotti microbici di interesse industriale vi sono inoltre enzimi come la glucosio-isomerasi, agenti farmacologicamente attivi come gli antibiotici, gli steroidi, specialità chimiche e additivi alimentari come il popolare aspartame, dolcificante per alimenti e bevande, e materie prime chimiche come l'etanolo.

Non sempre però la presenza di microrganismi negli alimenti è un fattore positivo. Se infatti i prodotti alimentari non vengono sottoposti a trattamenti che ne assicurano la corretta conservazione e la non contaminazione da parte di microrganismi si rischia non solo di diminuire le vendite, ma soprattutto di essere causa di gravi infezioni e intossicazioni alimentari. Una crescita microbica incontrollata e indesiderata distrugge grandi quantità di cibo causando significativi danni economici oltre che una cospicua perdita di sostanze nutritive. Recentemente negli Stati Uniti sono stati ritirati dal commercio ingenti quantità di cibi pronti a causa della contaminazione da *Listeria monocytogenes* (1).

Il deterioramento degli alimenti è rappresentato da qualunque modifica dell'aspetto, dell'odore e del sapore di un prodotto alimentare che lo renda inaccettabile al consumatore. Il cibo deteriorato non è sempre pericoloso per il consumo, ma in alcuni casi la deperibilità degli alimenti può essere causata da microrganismi patogeni. I cibi sono costituiti da sostanze organiche, per cui rappresentano una fonte di elementi nutritivi per la crescita di molti batteri chemiorganotrofici. Le caratteristiche fisico-chimiche degli alimenti determinano il loro grado di suscettibilità alla contaminazione microbica. Essi possono essere classificati in tre principali categorie in funzione della loro deteriorabilità: alimenti deperibili, che comprendono molti cibi freschi, alimenti semi deperibili e alimenti stabili o non deperibili. Queste categorie di cibi differiscono notevolmente in relazione alla loro umidità che è collegata all'attività dell'acqua ( $a_w$ ), definita come la quantità di acqua che può essere utilizzata dai microrganismi. Ogni microrganismo ha una soglia di attività dell'acqua al di sotto della quale è incapace di utilizzare l'acqua presente nell'alimento e quindi di svilupparsi (Tabella 1).

**Tabella 1**

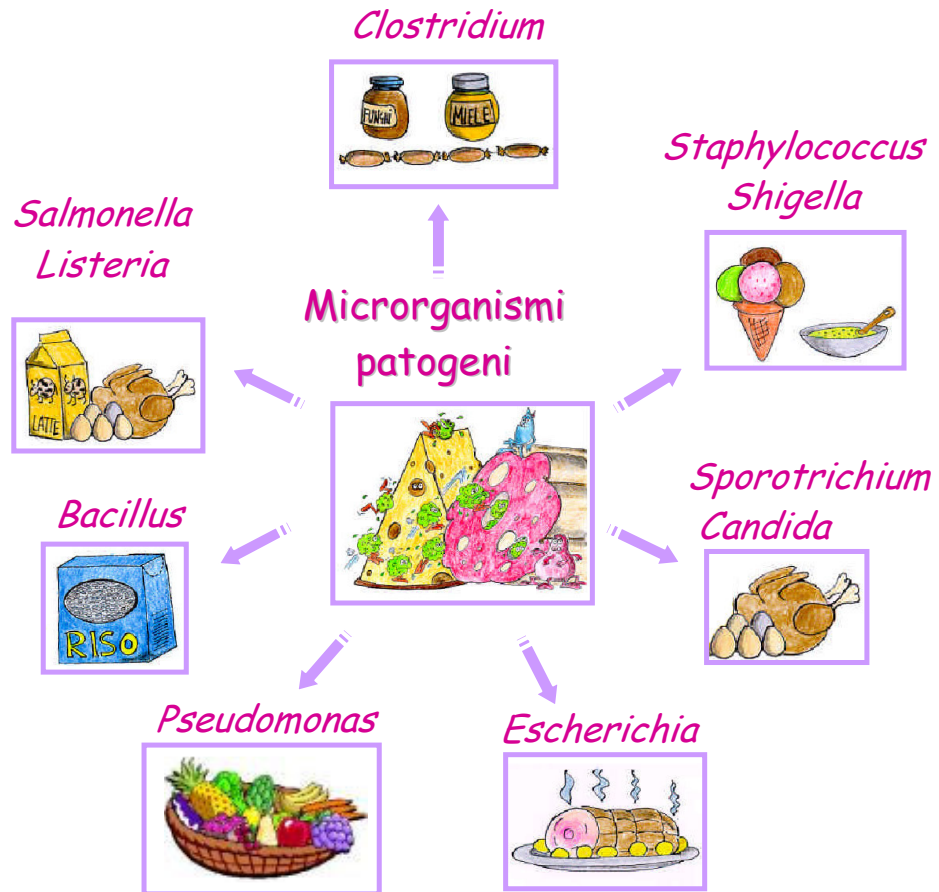
<b>Microrganismi</b>	<b>A<sub>w</sub> Limite</b>
Batteri	0.9
Lieviti	0.85
Muffe	0.80
Batteri alofili	0.75
Muffe xerofile	0.65
Lieviti saccarofili	0.60

In Tabella 2 sono riportati i valori di attività dell'acqua degli alimenti più comuni e il loro grado di deperibilità.

**Tabella 2**

	<b>Alimenti</b>	<b>A<sub>w</sub></b>
<b>Deperibili</b>	ortofrutta, carne, pesce, latte, mollica di pane; fino al 40% di zucchero o 7% di sale	1-0.95
	alcuni formaggi, prosciutto, succhi concentrati; fino al 55% di zucchero o 12% di sale	0.95-0.91
<b>Semi Deperibili</b>	salami, lievitati da forno, formaggi duri, margarina; fino al 65% di zucchero o 15% sale	0.91-0.87
	legumi con 15% acqua., riso, farina, dolci alla frutta	0.87-0.80
	marmellate, gelatine, marzapane, frutta candita	0.80-0.75
	torrone, caramelle, zucchero di canna, noci, frutta secca	0.75-0.65
<b>Non Deperibili</b>	frutta secca con 15-20% di acqua, miele, caramelle	0.65-0.60
	pasta secca, spezie, uovo in polvere, crackers, crosta del pane, latte in polvere	0.50-0.20

I cibi freschi sono deteriorati da numerosi tipi di batteri a seconda delle loro proprietà chimiche e sono, quindi, colonizzati dagli organismi più idonei a utilizzare i nutrienti disponibili (Figura 1).



**Figura 1**

Microrganismi patogeni e alimenti in cui è possibile riscontrarli

I batteri enterici quali *Salmonella*, *Shigella* ed *Escherichia*, ad esempio, sono tutti potenziali patogeni che risiedono nell'intestino degli animali, raramente sono responsabili del deterioramento di frutta e ortaggi, mentre spesso contaminano la carne. Al momento della macellazione i contenuti intestinali, compresi i batteri viventi, possono fuoriuscire e contaminare la carne. Analogamente i batteri lattici, che sono microrganismi molto comuni nella produzione casearia, sono i principali responsabili del deterioramento del latte e dei prodotti derivati.

Varie specie di *Pseudomonas* si trovano sia nel suolo sia negli animali e pertanto sono ampiamente coinvolte nel deterioramento di tutti i cibi freschi.

Lo sviluppo dei microrganismi negli alimenti segue il modello standard della crescita microbica. La velocità di crescita durante la fase esponenziale dipende dalla temperatura, dal valore nutritivo dell'alimento e da altre condizioni di crescita (pH,



presenza di ossigeno, sinergismo o antagonismo microbico). Il tempo necessario affinché la popolazione raggiunga una densità significativa in un certo prodotto alimentare dipende sia dall'entità dell'inoculo iniziale, sia dalla velocità di crescita durante la fase esponenziale. Solo quando la densità della popolazione microbica raggiunge un livello significativo, si osservano gli effetti del deterioramento. A tal proposito la Società canadese "Toronto company Toxin Alert" ha sviluppato una nuova pellicola di plastica che reagisce, cambiando colore, in presenza di agenti patogeni e sarebbe utile per prevenire possibili epidemie in quanto consentirebbe di rilevare anche una contaminazione di piccola entità (2). Durante la maggior parte della fase esponenziale di crescita, infatti, la densità della popolazione può essere così bassa che non si osserva alcun effetto; pertanto, solo l'ultima o le ultime due duplicazioni della popolazione determinano un deterioramento visibile. Ciò significa che durante la maggior parte delle fasi di crescita microbica, non ci sono modifiche visibili o facilmente individuabili della qualità del cibo.

Il consumo di cibo contaminato con determinati microrganismi o tossine microbiche può anche causare gravi malattie come intossicazioni o infezioni alimentari. L'intossicazione alimentare è la malattia che deriva dall'ingestione e successiva azione di tossine microbiche già prodotte presenti nell'alimento. I microrganismi che producono le tossine non devono necessariamente crescere nell'ospite e spesso non sono più vivi quando il cibo contaminato viene consumato. Esempi di intossicazioni alimentari sono rappresentati dalla intossicazione stafilococcica e dalla gastroenterite da *Bacillus cereus*.

L'infezione alimentare insorge quando l'alimento consumato contiene batteri patogeni che colonizzano l'intestino dell'uomo, si sviluppano e causano lesioni ai tessuti. In generale non è necessario che il batterio si moltiplichi nell'alimento, ma se ciò accade la probabilità di infezione aumenta; è il caso, ad esempio, della salmonellosi, della shigellosi, della listeriosi e dell'enterite da *Campylobacter*.

La tossinfezione alimentare è una combinazione delle due prime forme. Il microrganismo patogeno deve raggiungere cariche molto elevate nell'alimento e dopo l'assunzione da parte dell'uomo continua il suo sviluppo nell'intestino, libera la tossina che scatena la sintomatologia (esempi sono le gastroenteriti da *Clostridium perfringens* e da ceppi enterotossigeni di *Escherichia coli*). L'infezione da *Salmonella* è un tipico esempio di infezione alimentare. *Salmonella* è un batterio a bastoncello, Gram<sup>-</sup>, aerobio facoltativo correlato a *Escherichia coli*, *Shigella* e altri batteri enterici. La salmonellosi, è una malattia gastrointestinale che si verifica quando i cibi sono stati manipolati in scarse condizioni igieniche. *S. typhimurium*, provoca la grave patologia che è la febbre tifoide ed è l'agente più comune della salmonellosi nell'uomo. Le infezioni alimentari da *Salmonella* sono spesso collegate al consumo di prodotti quali carne, creme, panna per dolci, meringhe, torte e zabaione fatti con uova crude. Gli alimenti che subiscono la cottura a 70°C per almeno dieci minuti sono considerati sicuri se vengono immediatamente consumati, o se mantenuti a 50°C, oppure se conservati a 10°C o a temperature inferiori.

Numerosi ceppi di *Escherichia coli* sono potenziali patogeni di origine alimentare che agiscono primariamente nell'intestino e alcuni sono caratterizzati dalla capacità di produrre potenti enterotossine. Dopo l'ingestione di cibo o acqua contenenti un particolare ceppo, *E. coli* O157:H7, il microrganismo cresce nell'intestino tenue e produce la verotossina che causa gravi danni all'organismo. La causa più comune di questa infezione è il consumo di carni contaminate crude o poco cotte, specialmente la carne macinata prodotta per il consumo di massa che ha causato in passato diverse epidemie soprattutto negli stati americani.

La Shigellosi è un'altra grave gastroenterite invasiva di origine alimentare causata da *Shigella*, un batterio Gram<sup>-</sup>. Alcuni ceppi producono l'enterotossina e la tossina Shiga, quest'ultima responsabile della dissenteria batterica e molto simile alla verotossina di *E. coli* O157:H7. Gli alimenti associati ai batteri del genere *Shigella* sono l'insalata, la patata, il pollo, i vegetali, il latte e i prodotti derivati.

Anche i batteri Gram<sup>+</sup> sono spesso causa di infezioni e intossicazioni alimentari molto gravi. La listeriosi, ad esempio, è un'infezione alimentare gastrointestinale che può portare a batteriemia, meningite ed aborti (3) ed è causata da *Listeria monocytogenes* un patogeno alimentare che costituisce un rilevante ed emergente problema di salute pubblica. *L. monocytogenes* infatti è un organismo altamente versatile in grado di sopravvivere e proliferare in un ampio range di substrati (4). E' un batterio tollerante all'ambiente acido, psicrotollerante (tollerante al freddo), anaerobio facoltativo e tollerante alle alte concentrazioni saline. Ha la forma di bastoncello corto, non forma spore ed è molto diffuso nel suolo e nell'acqua, e in teoria nessun alimento fresco è esente da una potenziale sua contaminazione. Le tecniche di refrigerazione che normalmente rallentano la crescita microbica, sono inefficaci nel limitare la crescita di questo microrganismo psicrotollerante, pertanto la carne, i prodotti caseari e i cibi freschi in genere possono essere contaminati da questo patogeno. Dal momento che *L. monocytogenes* è suscettibile al calore e alle radiazioni, i cibi crudi e le attrezzature per la trasformazione alimentare possono essere facilmente decontaminati.

Tra i Gram<sup>+</sup> patogeni per l'uomo vi sono anche i batteri appartenenti al genere *Bacillus* che sono coinvolti nel deterioramento di una grande varietà di prodotti alimentari quali il latte, i prodotti a base di carne, prodotti caseari, fagioli, soia, patate, verdure, pasta, spezie etc (5). *Bacillus cereus* è un patogeno sporigeno molto diffuso in natura e frequentemente isolato da alimenti vegetali. Le spore sono resistenti a molti trattamenti al calore utilizzati nell'industria alimentare, quali la pastorizzazione, e alcune spore sono in grado di germinare e crescere alle temperature di conservazione dei cibi (6).

E' molto frequente, infatti la contaminazione da spore persistenti o da cellule vegetative negli alimenti sottoposti a trattamenti di conservazione; ciò è facilmente spiegabile in quanto è noto che le spore sono in grado di aderire ad un ampio spettro di materiali utilizzati durante il processamento degli alimenti (7) e le cellule vegetative possono essere incluse nei biofilm (8;9). Inoltre entrambe le forme mostrano alta resistenza ai processi di igienizzazione (10;11). A causa della sua potenziale patogenicità *B.cereus* costituisce un rischio per la salute pubblica ma data la bassa incidenza di intossicazioni alimentari serie è ancora considerato un patogeno alimentare minore (12). Alcune delle nuove tecniche di conservazione degli alimenti, però potrebbero influenzare questa situazione in quanto le industrie spingono sempre più verso l'utilizzo di trattamenti a temperature più basse per conservare le proprietà organolettiche degli alimenti e per realizzare procedure igieniche più leggere che contemporaneamente riducano il consumo di acqua e lo scarico di rifiuti. Ne consegue che l'utilizzo di tali tecniche potrebbe rendere le spore di *B. cereus*, le più resistenti al calore e/o ai processi di pulizia, un maggiore rischio per la salute. Di recente anche batteri appartenenti al gruppo *subtilis*, (*B. subtilis*, *B. licheniformis*, e *B. pumilus*) sono stati associati all'insorgenza di gastroenteriti alimentari (13).

Tra i più temibili agenti di intossicazioni alimentari vi è il *Clostridium botulinum*, di cui si conoscono diversi tipi, che agiscono sempre in assenza di ossigeno, in diversi ambienti e con differenti livelli di gravità. Si tratta di un batterio Gram<sup>+</sup> sensibile alla presenza di sale e nitrati, ma le cui spore resistono a temperature di 100 °C. Il

pericolo del botulino deriva dalla sua capacità di produrre una neurotossina estremamente potente che nell'organismo viene assorbita a livello dell'intestino tenue, per arrivare poi al sistema nervoso attraverso la circolazione sanguigna. La presenza di questo batterio si può riscontrare nelle conserve sott'olio di tipo domestico, non sottoposte a bollitura, o negli alimenti in scatola mal sterilizzati. In entrambi i casi le confezioni presentano spesso rigonfiamenti, dovuti ai gas prodotti dal batterio, che devono sempre essere considerate come un segnale d'allarme. Gli alimenti contaminati dal *C. botulinum* emanano cattivo odore e presentano in genere scarsa consistenza. Anche i funghi producono sostanze tossiche, alcune mortali come quelle prodotte da *Amanita phalloides*, *A. virosa* e *A. verna*. Si tratta di sostanze (amanitine e falloidine) che agiscono sugli enzimi cellulari.

La possibilità di conservare gli alimenti per lunghi periodi di tempo in condizioni ottimali ha da sempre spinto la ricerca scientifica e tecnologica verso nuove metodologie. Le tecniche di conservazione degli alimenti si basano su trattamenti ad azione fisica (esposizione dei cibi ad alte o basse temperature, ad azioni meccaniche oppure a radiazioni ionizzanti) oppure su trattamenti ad azione fisicochimica (affumicamento, aggiunta di sostanze chimiche agli alimenti).

Le tecniche più antiche nascono dall'osservazione della diversa velocità di decomposizione dei cibi a seconda della loro esposizione al caldo, al freddo, all'aria, e alla presenza di acqua, sale o zucchero. La grande sensibilità dei microrganismi al calore ha ispirato lo studio degli effetti delle temperature, basse o alte, sul loro sviluppo e ne sono derivate tecniche e trattamenti in grado di sfruttarli. La temperatura elevata può bloccare la moltiplicazione dei microrganismi mostrando un'azione microbica o inibire momentaneamente la crescita.

Nel primo caso si parla di sterilizzazione, il trattamento termico condotto a temperature superiori ai 100 °C. I microbi e le loro spore vengono annientati quasi totalmente. Le eventuali spore resistenti non sono comunque in grado di germinare, se non in condizioni ambientali molto particolari. La conservazione dei cibi sterilizzati è molto lunga; perciò questa tecnica è molto usata per i cibi in scatola. Con questo procedimento si eliminano tutti i microrganismi presenti nei liquidi e nei solidi. Il prodotto comunque non è del tutto asettico e non può mantenersi all'infinito; per ottenere una sterilizzazione completa infatti occorrerebbero, oltre alle temperature impiegate, tempi molto lunghi con grosse perdite nutritive. La sterilizzazione viene utilizzata sia per i prodotti confezionati che sfusi, ma affinché l'azione del calore sia duratura, occorre che il prodotto da sterilizzare sia racchiuso in recipienti nei quali è possibile creare il vuoto. Si realizza a diversi livelli di temperatura per un intervallo di tempo variabile in rapporto alla temperatura stessa e ai diversi alimenti. La relazione temperatura-tempo per la conservazione in scatola dipende dal tipo di alimento, dal suo pH, dalla dimensione del contenitore e dalla consistenza e densità del cibo. Dal momento che il calore deve penetrare completamente al centro del cibo all'interno della lattina, il tempo di riscaldamento deve essere più prolungato per lattine grandi o cibi più consistenti. Gli alimenti acidi possono essere efficacemente inscatolati riscaldandoli solo fino alla bollitura, cioè a 100 °C, mentre i cibi non acidi devono essere scaldati a temperature da autoclave.

La sterilizzazione in autoclave per qualche minuto, a 115 °C circa distrugge o blocca l'attività di enzimi, microrganismi e tossine e rende gli alimenti più facilmente digeribili, mantenendone intatto il valore nutritivo, salva il potenziale della vitamina C e della vitamina B1. Questo trattamento è valido per una grande varietà di prodotti come legumi, frutta, carne, pesce ed alimenti cucinati, ed è efficace molto a lungo, tranne per gli alimenti molto acidi come i succhi di frutta e la salsa di pomodoro.

Mediante riscaldamento a più di 115 °C, dai 20 ai 30 minuti, invece, si possono rendere i cibi batteriologicamente puri ma ne diminuisce il valore proteico, lasciando comunque intatti i contenuti di vitamina A e di vitamina B2. A temperatura superiore ai 140 °C per pochi secondi viene sottoposto soprattutto il latte, di cui non si altera il valore nutritivo ed il gusto, ed il trattamento di sterilizzazione viene indicato con la sigla UHT (**Ultra High Temperature**).

Al di sotto dei 100°C si entra nel campo della pastorizzazione un processo che ha azione batteriostatica sui microrganismi. La pastorizzazione distrugge la microflora dei liquidi organici anche oltre il 99 per cento, ma poiché non si raggiungono temperature sufficienti a devitalizzare i microrganismi termofili, né le spore, l'alimento pastorizzato deve comunque essere conservato in condizioni atte a limitare lo sviluppo di questi microrganismi. Con il processo di pastorizzazione le proprietà fisicochimiche ed il gusto dei prodotti sono conservate praticamente inalterate per un periodo di tempo differente in rapporto ai prodotti stessi.

Generalmente la pastorizzazione si applica a latte, birra, vino, budini, dessert, succhi di frutta ed è seguita da un rapido raffreddamento del prodotto, spesso associato ad altri sistemi di conservazione. Il raffreddamento dell'alimento ha anche lo scopo di evitare che le alte temperature danneggino eccessivamente le caratteristiche organolettiche e nutrizionali del prodotto. La temperatura della pastorizzazione classica del latte è di 63 °C per un periodo di 30 secondi. Per garantirsi più ampi margini di sicurezza alimentare, spesso si utilizzano temperature più elevate, 72 °C e oltre, per tempi più brevi. In ogni caso i cibi pastorizzati vanno conservati a freddo e soltanto per brevi periodi, per limitare lo sviluppo dei microbi che non sono stati eliminati con il trattamento. Le tecniche di conservazione degli alimenti prevedono anche l'utilizzo delle basse temperature che arrestano le attività dei microrganismi sporigeni preservando gli alimenti dalla contaminazione microbica per lunghi periodi di tempo (14) anche se le spore batteriche sono estremamente resistenti agli effetti del congelamento (15).

Le basse temperature causano la formazione di cristalli di ghiaccio, che aumentano il volume delle cellule microbiche causando la rottura delle pareti cellulari con conseguente morte ed hanno quindi azione battericida.

Durante il processo di refrigerazione vengono raggiunte temperature comprese tra 0 °C e -5 °C o -6 °C che hanno quindi un effetto molto debole sullo sviluppo microbico e sono sufficienti a bloccare la crescita di alcuni microrganismi patogeni, come la *Salmonella*, permettendo perciò una conservazione dei cibi a breve termine.

Il congelamento e surgelamento sono invece trattamenti termici in grado di portare velocemente la temperatura molto al di sotto dello zero, inibendo lo sviluppo microbico. Il surgelamento, in particolare, viene fatto a livello industriale e permette di raggiungere la temperatura di -18 °C all'interno del cibo in poche ore e di mantenerla fino alla commercializzazione. L'efficacia di questi trattamenti dipende dal mantenimento della cosiddetta catena del freddo, dalla produzione fino alla vendita, in quanto eventuali sbalzi termici causano alterazioni a livello organolettico e variazioni della carica microbica. Gli alimenti surgelati sono soggetti a trasformazioni delle qualità nutritive e organolettiche. Le proteine subiscono denaturazione, divenendo più digeribili senza nessuna perdita di qualità. I grassi subiscono idrolisi e irrancidimento, soprattutto quelli polinsaturi mentre i glucidi subiscono un lento processo di idrolisi e i minerali e le vitamine vengono in parte perdute durante il processo di scottatura a cui sono sottoposti gli ortaggi prima del processo di surgelazione.

Associando al trattamento refrigerante la modifica della composizione chimica dell'atmosfera che circonda l'alimento si può prolungare notevolmente la durata dei prodotti. L'atmosfera può essere modificata in vario modo: la conservazione in atmosfera controllata, ad esempio è utilizzata per conservare gli alimenti nei depositi, oppure direttamente nelle confezioni che verranno vendute al consumatore. E' una tecnica molto utilizzata per conservare frutta e verdura (soprattutto mele, pere e agrumi) fino a 7-8 mesi consentendone la reperibilità per tutto l'anno. Il meccanismo di conservazione consiste nel mantenere il tenore di ossigeno al di sotto del fabbisogno respiratorio del prodotto (inferiore al 4%, contro il 21% dell'aria), sostituendolo con azoto e anidride carbonica.

La conservazione in atmosfera modificata invece, si ha quando la composizione dell'aria è modificata dalla respirazione del prodotto: si verifica quindi un abbassamento del tenore di ossigeno e un aumento di anidride carbonica, che impedisce il deterioramento e la formazione di muffe in frutta, verdura e cereali. Per tale trattamento le atmosfere impiegate sono a base di ossigeno, anidride carbonica, azoto. Questi ultimi due composti inibiscono la formazione di muffe, lieviti e batteri, e l'alterazione dei lipidi. Sono anche consentiti argon, elio e protossido di azoto. Sulla confezione deve figurare l'indicazione "prodotto confezionato in atmosfera protettiva". La modifica dell'atmosfera può avvenire anche senza l'aggiunta di gas: è il caso del confezionamento sottovuoto o in "cryovac". Lo scopo è sempre quello di ridurre la quantità di ossigeno inibendo le reazioni ossidative e lo sviluppo dei microorganismi aerobi. Il prodotto viene confezionato sottovuoto in sacchetti di cloruro di polivinile e successivamente immerso per pochi secondi a 90 gradi: questo materiale è termoretraibile perciò aderisce perfettamente all'alimento. Questa tecnica è utilizzata soprattutto per il confezionamento di carni fresche e insaccati (cotechini, wurstel, prosciutti cotti, affettati). Il confezionamento sottovuoto può determinare una perdita delle qualità dell'alimento a causa del fatto che l'umidità e alcuni gas e sostanze volatili possono essere estratti dall'alimento, anche se il fenomeno è limitato dall'ermeticità del confezionamento e dal poco volume a disposizione.

Il pH o acidità rappresenta un altro fattore determinante per la crescita microbica negli alimenti. I cibi hanno pH variabile, ma la maggior parte di essi mantiene un pH neutro o acido. I microrganismi differiscono nella loro capacità di crescere a condizioni acide, ma un pH inferiore a 4 inibisce la crescita della maggior parte dei microrganismi in grado di alterare gli alimenti. Pertanto, l'acido è spesso usato nella conservazione dei cibi nel processo della conservazione sottaceto. I cibi sottaceto più comuni sono i cetrioli, i peperoni, la carne, il pesce e la frutta. Anche l'aggiunta di sali o zuccheri per ridurre la disponibilità dell'acqua per i microrganismi rappresenta un processo di conservazione degli alimenti molto utilizzato. Nel cibo, in alcuni casi si può sviluppare acido per effetto dell'attività microbica; pertanto il prodotto viene definito cibo fermentato, come i crauti, lo yogurt, il formaggio e la panna acida. I microrganismi coinvolti nella fermentazione degli alimenti sono i batteri lattici e i batteri acetici. Questi batteri non crescono a pH inferiori a 4, e pertanto la fermentazione risulta un processo autolimitante.

Alcune tecniche di conservazione antiche e moderne si basano su trattamenti ad azione meccanica. L'essiccazione, che sfrutta risorse naturali come il sole e le correnti d'aria, è senza dubbio uno dei metodi più antichi. Il suo principio, su cui si fondano anche altri sistemi di conservazione, è quello dell'eliminazione di gran parte del contenuto in acqua dei cibi per bloccare lo sviluppo microbico. Si tratta di un procedimento naturale che garantisce la lunga durata della conservazione, ma provoca spesso negli alimenti dei cambiamenti di forma, di gusto e di colore, che li

rendono piuttosto diversi dai prodotti iniziali (si pensi ad esempio alla differenza tra pomodori freschi e pomodori secchi).

L'affumicamento della carne e soprattutto del pesce si ottiene esponendo i prodotti, dopo leggera salatura, ai fumi che si sprigionano dalla combustione di determinati tipi di legno più o meno aromatico di varie specie vegetali, quali alloro, rosmarino, ginepro, faggio, quercia, castagno, pioppo, alla temperatura di 80-100°C per 30 min o 20-25°C per vari giorni con il 70-75 per cento di umidità relativa. Per favorire la penetrazione del fumo in genere l'alimento è preventivamente salato. Il fumo esplica una azione conservante oltre a conferire particolari caratteristiche organolettiche. L'azione conservante è dovuta a vari componenti del fumo ed in particolare all'aldeide formica (oltre che al cresolo, guaiacolo, metanolo, etanolo, ecc.), alla sottrazione di acqua e alla coagulazione delle proteine. Per altro, nel fumo si trovano composti dannosi all'organismo umano tra i quali gli idrocarburi policiclici aromatici che, secondo alcuni autori, risultano poco dannosi nella forma in cui sono generalmente presenti negli alimenti affumicati.

Altra tecnica di conservazione molto efficace è rappresentata dalla liofilizzazione che consiste nel congelamento del prodotto e nella successiva disidratazione sotto vuoto, in modo che il ghiaccio sublimi direttamente in vapore, senza recare danni alle cellule. Questa tecnica mantiene molte proprietà nutritive dell'alimento di partenza, ma è un trattamento costoso e viene perciò riservato agli alimenti per la prima infanzia, al the e al caffè.

Tra i trattamenti ad azione fisica è di notevole interesse l'utilizzo di radiazioni ionizzanti che rappresenta un metodo standard per ridurre la contaminazione da parte di funghi, batteri e anche insetti soprattutto per la frutta, le verdure e la carne (1). Per la conservazione dei cibi sono efficaci le radiazioni a lunghezza d'onda corta, quali i raggi gamma provenienti da fonti di  $^{60}\text{Co}$  e  $^{137}\text{Cs}$ , in grado di ionizzare le molecole che incontrano sul loro percorso. Molti alimenti (patate, aglio, cipolle, funghi, frutta fresca, carne, ecc.) vengono perciò trattati con radiazioni ionizzanti in grado di prevenirne la decomposizione e la produzione di agenti tossici da parte dei microrganismi.

Negli Stati Uniti, i prodotti a base di carne fresca quali hamburger e i derivati del pollame, possono attualmente essere irradiati per limitare la contaminazione dovuta ad *E. coli* O157:H7 in quanto rappresenta il solo mezzo efficace per assicurare la decontaminazione dopo la macinatura, dal momento che questa può distribuire il patogeno all'interno della carne, e non solo sulla superficie.

Il vantaggio dell'irradiazione è che consente di eliminare gli agenti patogeni e di prolungare la conservazione degli alimenti senza apprezzabili variazioni fisiche o chimiche (16).

Gli ultrasuoni, che sono stati sperimentati per il trattamento di latte e formaggi, hanno effetto battericida ma secondariamente provocano cambiamenti di natura fisico-chimica ed enzimatica non desiderati per cui non sono molto utilizzati.

I raggi ultravioletti presentano azione battericida a particolari lunghezze d'onda, ma hanno scarsa forza di penetrazione e vengono perciò utilizzati per trattare (superficialmente) gli ambienti e le attrezzature usate per le lavorazioni degli alimenti.

I trattamenti ad azione chimica consistono nell'aggiungere particolari sostanze chimiche, classificate come additivi, che hanno la funzione di migliorare e preservare la qualità degli alimenti e, spesso, di migliorare l'efficacia della lavorazione.

La domanda da parte dei consumatori e gli sviluppi più recenti nel campo della scienza e della tecnologia alimentare hanno portato ad un uso più diffuso e vario degli additivi alimentari. Grazie a questi, oggi siamo in grado di gustare cibo sano, di

alta qualità e a costi contenuti. Per additivi alimentari, nel senso più ampio del termine, si intendono tutte le sostanze che vengono aggiunte al cibo per aumentarne la sicurezza, il valore nutrizionale e/o l'aspetto o il gusto. Gli additivi vengono utilizzati per conservare, per miscelare, per addensare gli alimenti o per esaltarne il sapore o il colore, e comprendono ad esempio il lievito in polvere nei preparati per dolci o gli agenti gelatinizzanti nella marmellata.

Gli additivi possono derivare da fonti molto diverse: possono essere di origine vegetale, come ad esempio gli agenti addensanti estratti dai semi, dalla frutta e dalle alghe marine, o gli acidificanti, come l'acido tartarico ricavato dalla frutta, o possono essere prodotti identici a quelli naturali ma ottenuti per sintesi o biosintesi; in questa categoria troviamo gli antiossidanti, come l'acido ascorbico nella frutta e il tocoferolo negli oli vegetali, e coloranti come i carotenoidi contenuti in molti tipi di frutta e ortaggi. Tra gli additivi ottenuti modificando sostanze naturali troviamo gli emulsionanti (derivati da oli commestibili e acidi organici) o agenti addensanti come gli amidi modificati e la cellulosa modificata. Esistono inoltre additivi creati dall'uomo: antiossidanti come l'idrossianisolo butilato (BHA), alcuni coloranti (per esempio chinolina e indigotina) e dolcificanti come la saccarina.

Gli additivi sono divisi in categorie in base alle loro funzioni e sono individuati ciascuno da un codice come riportato in Figura 2.

L'impiego di additivi è regolamentato da alcune direttive e vi sono comitati scientifici che forniscono consigli sulla loro sicurezza. Organizzazioni internazionali come Codex Alimentarius eseguono costantemente valutazioni sulla sicurezza degli additivi che viene valutata in base a diversi criteri: le modalità con le quali vengono assorbiti dall'organismo, la loro stabilità quando contenuti in diversi alimenti o bevande e le quantità nelle quali possono essere consumati con sicurezza. La sicurezza d'uso e quindi la tutela del consumatore sono assicurate da studi tossicologici che consentono la definizione della Dose Giornaliera Ammissibile (DGA). Sulla base della DGA vengono definite le modalità d'uso del singolo additivo. Ogni additivo, in genere, ha un limite di impiego, il più delle volte nell'ordine di milligrammi per chilo o litro di prodotto alimentare nel quale viene messo, in altri casi secondo la formula "quanto basta". Tali dosi fanno riferimento alla DGA che, a scopo precauzionale, è, per l'uomo, la centesima parte di quella che è risultata innocua per l'animale da laboratorio sul quale è stata sperimentata per molti anni e con varie prove. Per ogni additivo, quindi, si pretende una sicurezza al cento per cento; inoltre è vietato usare additivi che non siano espressamente autorizzati e inclusi nella lista di quelli permessi (la cosiddetta "lista positiva") dopo ripetute prove scientifiche.

E' possibile affermare che l'innovazione nel campo tecnologico in associazione con le valutazioni tossicologiche degli esperti garantirà sempre più la tutela del consumatore da effetti tossici associati agli alimenti. Gli additivi indicati in etichetta sono tutti autorizzati dall'Unione Europea e sono utilizzati dai produttori solo se necessario e secondo le dosi prescritte.

Tra gli additivi, i conservanti sono principalmente costituiti da sostanze chimiche alcune delle quali sono state di recente classificate come "dannose" per l'uomo ed è per questo che una recente tendenza nei processi di preparazione dei cibi è di abbandonare l'uso di tali conservanti chimici e di cercare alternative antimicrobiche naturali. Oggi giorno infatti vi è una pressione crescente sulle industrie alimentari per ridurre il loro utilizzo di conservanti chimici. Un vantaggio nel ricercare una proteina o un peptide antimicrobici e non una sostanza di sintesi chimica potrebbe risiedere nel fatto che una sostanza chimica è pur sempre una molecola nuova che l'organismo incorpora e la cui degradazione da parte delle cellule non è facilmente prevedibile.

rispetto ad una proteina che, se pur estranea, è costituita da aminoacidi che la cellula di qualsiasi organismo è in grado di degradare.



**Figura 2**

Additivi alimentari e rispettive funzioni

Le ricerche in questo campo si sono concentrate sia sullo studio di tutte quelle molecole di origine procariotica ed eucariotica che hanno attività antimicrobica e che in natura rappresentano una difesa contro i microrganismi patogeni per gli organismi che le producono (17) sia verso molecole derivate da prodotti vegetali come ad esempio la lilina, una proteina ricca in arginina e acido glutammico, estratta dai bulbi del giglio con una potente attività anti fungina (18), o il basilico che sembra avere effetto antibatterico sia su batteri Gram<sup>+</sup> che su Gram<sup>-</sup> (19). Tra i vari composti antimicrobici naturali, le batteriocine prodotte da batteri lattici e da stafilococchi hanno generato negli ultimi venti anni un grande interesse grazie al loro potenziale uso come bio-conservanti. Le batteriocine vengono definite come proteine biologicamente attive che talvolta sono soggette a modifiche post-traduzionali o complessi proteici in grado di esercitare attività battericida nei confronti di altre specie batteriche, ma non del microrganismo produttore (20). La nisina è l'esempio più noto di una batteriocina prodotta dai batteri lattici, attualmente riconosciuta ed utilizzata come conservante nei cibi (codice E234) (21). Vi sono alcuni esempi di peptidi antimicrobici prodotti da batteri Gram<sup>-</sup> come la microcina J25 prodotta da *E.coli*, efficace contro i Gram<sup>-</sup> (22). E' noto in letteratura che la maggior parte degli



agenti antimicrobici è costituita da peptidi o polipeptidi cationici e anfipatici che tendono ad assumere una struttura ad  $\alpha$  elica o peptidi che assumono una struttura a foglietto beta (23), ma vi sono anche alcuni esempi di peptidi anionici alcuni dei quali richiedono zinco per la loro massima attività (24). Questi peptidi spesso sono a basso peso molecolare e derivano da un ampio spettro di organismi (25) quali l' $\epsilon$ -poly-L-lisina prodotta da batteri (26), peptidi tipo  $\epsilon$ -poly-L-lisina dai funghi (27) la defensina dagli animali superiori e dalle piante (28) ed in generale si può affermare che molti organismi producono peptidi policationici come meccanismo di difesa contro i microrganismi patogeni.

L' $\epsilon$ -poly-L-lisina per le sue caratteristiche di stabilità alle alte temperature, alle condizioni acide e alcaline, e soprattutto di non tossicità, è prodotta industrialmente in Giappone come additivo nei cibi mediante un processo di fermentazione aerobica effettuato da *Streptomyces albulus* organismo da cui è stata isolata (29). Come conservante dei cibi  $\epsilon$ -poly-L-lisina può essere utilizzato da solo o in associazione con altri additivi quali la glicina, l'etanolo, aceto.

Alcuni ricercatori hanno sviluppato un metodo rapido per saggiare sostanze secrete nel mezzo di coltura in cui crescono i microrganismi (26). Tale metodo prevede l'utilizzo di un colorante acido, Poly R-478. Il principio è di rilevare l'interazione tra i gruppi carichi positivamente dell'  $\epsilon$ -poly-L-lisina con il colorante acido. Con un colorante acido incorporato in una piastra di agar, i microbi producono polimeri basici come  $\epsilon$ -poly-L-lisina che potrebbero essere visualizzati come colonie distinte sulla piastra in cui il colorante si condensa intorno alla colonia del microrganismo. Poiché questo metodo è applicabile a mezzi di coltura solidi, è possibile analizzare numerosi microrganismi nello stesso tempo. Mediante questo metodo Nishikawa ed Ogawa hanno isolato vari microrganismi in grado di produrre  $\epsilon$ -poly-L-lisina e anche un fungo *Verticillium kibiense* in grado di produrre un peptide ad azione antimicrobica (30). Mediante spettrometria di massa e sequenziamento peptidico hanno evidenziato che si tratta di un peptide lineare composto da unità ripetute di arginina-istidina. Il numero delle ripetizioni è nella maggior parte dei casi 5 e in alcuni o casi 4 o 6. Questo peptide ha mostrato attività antibatterica contro un ampio spettro di batteri e funghi ma tale attività si riduce molto in presenza di alte concentrazioni saline. Mediante marcatura con fluoresceina all'N-terminale del peptide è stato possibile evidenziare la sua capacità di permeare la membrana batterica svolgendo probabilmente la sua funzione all'interno di essa.

Con tale metodo innovativo sarà possibile individuare numerosi microrganismi in grado di produrre peptidi antimicrobici ed ingegnerizzarli per sfruttarli su scala industriale come produttori di bioconservanti.

Allo scopo di poter facilmente isolare e sintetizzare nuove molecole antimicrobiche le ricerche scientifiche sono rivolte anche alla caratterizzazione di motivi strutturali e sequenze amminoacidiche responsabili dell'attività antimicrobica. Andersson et al. (31) hanno dimostrato che i peptidi antimicrobici umani quali  $\alpha$ -defensina e LL-37 legano i glicosaminoglicani (eparina e dermatan solfato) e che i motivi strutturali associati con l'affinità per l'eparina (cationicità, anfipaticità, e regioni consenso) potrebbero conferire proprietà antimicrobiche ad un dato peptide. L'affinità per tali glicosaminoglicani potrebbe essere sfruttata come ulteriore metodo per isolare nuovi peptidi attivi.

Il meccanismo d'azione delle molecole antimicrobiche naturali non è del tutto chiaro, si pensa che vi sia un'attrazione elettrostatica tra queste molecole cariche positivamente e le cariche negative dell'involucro cellulare, e che un'adeguata

concentrazione provoca l'inibizione della crescita o la morte cellulare dei microrganismi dovuta al rilascio di ioni  $K^+$ , ATP e enzimi intracellulari (32).

Sembrerebbe che la struttura ad  $\alpha$  elica assunta da tali peptidi sia importante per un'efficace attività antimicrobica. Infatti studi condotti sulla granulicina, agente antimicrobico prodotto dai linfociti T ricco in amminoacidi basici, hanno dimostrato che la denaturazione del polipeptide con conseguente riduzione del contenuto in  $\alpha$  elica dal 48 al 18% inibisce completamente l'attività antimicrobica. Modifiche nei residui di arginina della granulicina causano la completa inibizione dell'attività antimicrobica, laddove le modifiche di lisina non riducono tale attività, sottolineando che probabilmente l'attività antimicrobica si esplica in seguito all'interazione tra i residui carichi positivamente dell'arginina e quelli carichi negativamente dei fosfolipidi presenti sulla superficie dei patogeni (33). Nel caso della lisina Z è stato dimostrato che i suoi tre residui di lisina sono critici per l'interazione con la membrana citoplasmatica e l'inizio del processo di permeabilizzazione, ma non se ne conosce ancora il ruolo preciso (34). Tale evidenza dimostra che in base alla natura delle molecole possono essere critici sia i residui di arginina che di lisina.

Modifiche a carico degli  $\alpha$  amino gruppi dell' $\epsilon$ -poly-L-lisina riducono l'attività antimicrobica suggerendo l'importanza dei gruppi basici per tale attività (35). E' stato dimostrato, su un peptide antimicrobico modello che se si aumenta la carica positiva alla sua estremità N-terminale o C-terminale, senza sostanziali modifiche alla struttura secondaria, aumenta la sua attività antifungina ma non quella antibatterica evidenziando che la carica positiva netta potrebbe giocare un ruolo importante nella specificità tra funghi e batteri Gram<sup>+</sup> (36).

Il lisozima è ben noto per le sue proprietà antimicrobiche ed è stato considerato di notevole interesse per il suo potenziale utilizzo come conservante naturale nei cibi. L'attività antimicrobica del lisozima è però limitata ad alcuni batteri Gram<sup>+</sup> attraverso il suo enzima muramidasi che può idrolizzare lo strato di peptidoglicano nella parete cellulare dei batteri Gram<sup>+</sup> (37) e solo di recente è stato caratterizzato un peptide da esso derivato (LzP) molto attivo sulle specie di *Bacillus* più pericolose per l'industria alimentare. LzP è risultato essere attivo anche sulle spore di tali batteri che sono la causa spesso di gravi infezioni alimentari. L'unico processo che consente di eliminare le spore è la sterilizzazione ed è stato osservato che l'LzP conserva la sua attività antibatterica anche in seguito a tale trattamento suggerendo un suo possibile utilizzo come conservante nei cibi associato ad un processo di sterilizzazione, garantendo una conservazione più duratura (38).

Nella maggior parte dei casi, i polipeptidi antimicrobici sono costituiti da almeno quattro diversi amminoacidi, ed essi potrebbero avere strutture e funzioni più complesse dei poli(aminoacidi) composti di soli uno o due tipi di amminoacidi. L' $\epsilon$ -poly-L-lisina è considerato l'unico esempio di un poli aminoacido antimicrobico biosintetizzato, sebbene il suo meccanismo d'azione non è noto (30). Nell'ambito della ricerca di nuovi peptidi antimicrobici vi sono esempi di peptidi derivati dalla digestione con enzimi quali la tripsina o la chimotripsina di proteine, come l'ovalbumina che normalmente non hanno tale attività. L'attività antibatterica dei peptidi derivati da simili proteine è della stessa grandezza di quella determinata per i peptidi derivati da proteine presenti nei cibi quali la lattoglobulina, la caseina, la lactoferrina (39). L'assunzione di cibo quindi potrebbe non solo avere funzione nutritiva ma fornire l'organismo, in seguito a digestione delle proteine di cui è composto da parte degli enzimi presenti nel tratto gastrointestinale dei mammiferi, di peptidi antimicrobici che difendono l'organismo dagli agenti infettivi (40).

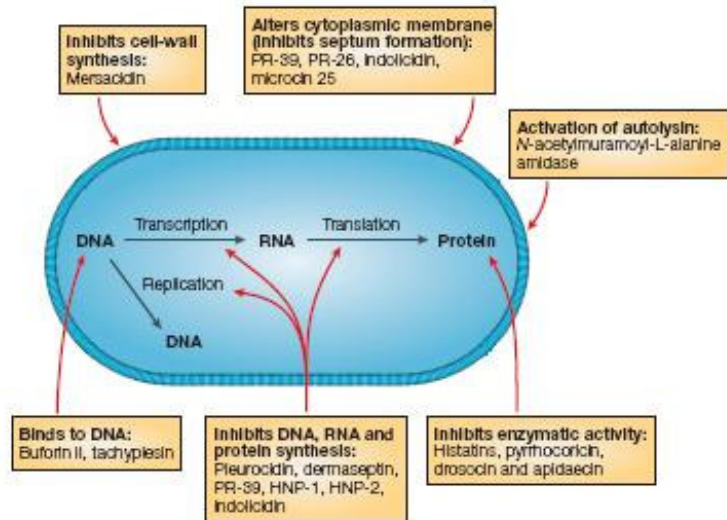
Di recente sono stati isolati tre peptidi derivati dalla caseina bovina e prodotti da *Lactobacillus acidophilus* durante il processo di fermentazione che potrebbero rivelarsi utili bioconservanti del latte per prevenire le infezioni associate a *Enterobacter sakazakii* nei neonati (41). Tra le molecole ad attività antibatterica vi sono anche alcuni dati preliminari sull'attività di protammine (32) e di istoni (42) che normalmente svolgono la funzione di compattare il nucleo delle cellule eucariotiche. Gli istoni, come è noto sono proteine basiche di diverso tipo (H1, H2A, H2B, H3, H4) che costituiscono l'unità di base della cromatina delle cellule eucariotiche, il nucleosoma. L'istone H1 rappresenta l'istone linker che stabilizza il legame del DNA intorno al nucleosoma e presenta una struttura tripartita costituita da un dominio globulare fiancheggiato dalle code N- e C- terminali altamente basiche che sono non strutturate in soluzione (43) ma assumono struttura secondaria in seguito all'interazione con il DNA (44) che nel caso dell'istone H1 di spermatozoi di *Chaetopterus variopedatus* sembrerebbe verificarsi mediante l'interazione del fosfato del DNA con i residui di lisina e arginina dell'istone H1 (45). Le protammine sono le molecole più basiche (pI 11-13) presenti in natura con un peso molecolare di circa 4000 Da. Possono essere isolate dalle cellule spermatiche di pesci, uccelli e mammiferi ed alcune di esse, come quelle estratte da spermatozoi di salmone (salmina) e di aringa (clupeina) sono reperibili in commercio. Alcune di esse sono resistenti al calore e mostrano attività antibatterica anche in seguito a sterilizzazione. Sembrerebbe che esercitino un'azione litica con successiva condensazione citoplasmatica sulle cellule batteriche (46). E' stato ipotizzato che la carica delle molecole possa essere un fattore molto importante per l'attività antibatterica ma ben poco è stato riportato sulla relazione tra la carica di superficie e la suscettibilità del microrganismo bersaglio. Recenti studi hanno indicato che tutti i peptidi antimicrobici interagiscono con la membrana batterica e si è cercato di classificarli in due gruppi sulla base del possibile meccanismo d'azione: membrana-distruittiva e non membrana-distruittiva (47). Una ipotesi alternativa è che i peptidi cationici antimicrobici svolgano azioni multiple sulle cellule, dalla permeabilizzazione della membrana agli effetti sulla parete cellulare e sulla divisione, all'inibizione della sintesi di macromolecole (Figura 3A) e che l'azione responsabile della morte della cellula batterica varia da peptide a peptide e da batterio a batterio per un dato peptide (48). Per i peptidi che tendono ad assumere una struttura ad alfa elica sono stati ipotizzati due possibili meccanismi d'azione illustrati in Figura 3 B. Nel primo, modello "doga di botte" ("barrel stave") il peptide anfipatico ad alfa elica si inserisce nel core idrofobico della membrana e forma pori trans membrana. La superficie idrofobica del peptide interagisce con il core lipidico della membrana e la superficie idrofilica è rivolta verso l'interno, formando un poro. I passaggi ipotizzati per tale meccanismo sono: i monomeri di peptide si legano alla membrana in una struttura ad alfa elica, si riconoscono l'un l'altro nella conformazione legata alla membrana già a bassa densità di superficie del peptide legato, le alfa eliche si inseriscono nel core idrofobico della membrana ed infine si verifica il progressivo reclutamento di monomeri che aumentano la grandezza del poro. Uno step cruciale in tale meccanismo è rappresentato dall'assemblaggio dei monomeri sulla superficie della membrana prima che si inserisca il peptide in quanto è energeticamente sfavorevole per una singola alfa elica attraversare la membrana come monomero. E' ragionevole assumere che quando questi peptidi possono inserirsi nel core idrofobico della membrana, la loro interazione con la membrana bersaglio è guidata principalmente da interazioni idrofobiche, e di conseguenza essi dovrebbero legarsi ai fosfolipidi di membrana indipendentemente dalla loro carica.

Nel secondo modello, “a tappeto” (“carpet”), i peptidi che non devono necessariamente assumere una struttura ad alfa elica, vengono in contatto con i gruppi delle teste lipidiche durante l'intero processo di permeazione della membrana e non si inseriscono nel core idrofobico della membrana. I peptidi litici inizialmente si legano sulla superficie della membrana bersaglio e la ricoprono come un tappeto. La permeazione della membrana si verifica solo se c'è un'alta concentrazione locale di peptidi legati ad essa. L'alta concentrazione locale sulla superficie della membrana può verificarsi sia dopo che tutta la superficie è ricoperta con monomeri di peptidi, o alternativamente, in seguito ad un'associazione tra i peptidi legati alla membrana, che porta alla formazione di un tappeto localizzato. Nel modello a “tappeto” a differenza di quello a “doga di botte” i peptidi non si inseriscono nel core idrofobico della membrana né si assemblano l'un l'altro con le loro superfici idrofiliche. Inoltre un peptide che permea la membrana mediante questo meccanismo non necessariamente richiede l'assunzione di una specifica struttura secondaria per il suo legame con la membrana. L'interazione iniziale con le cariche negative della membrana bersaglio è guidata da interazioni elettrostatiche e quindi i peptidi sono carichi positivamente. I quattro passaggi proposti per questo meccanismo sono: il legame preferenziale dei monomeri del peptide ai gruppi delle teste lipidiche, l'allineamento dei monomeri di peptide sulla superficie della membrana così che la loro superficie idrofila è rivolta ai gruppi delle teste dei fosfolipidi o alle molecole d'acqua, la rotazione delle molecole che porta al riorientamento dei residui idrofobici attraverso il core idrofobico della membrana ed infine la disgregazione della membrana mediante distruzione della curvatura del doppio strato. Uno step precoce precedente al collasso della membrana potrebbe includere la formazione di pori transienti nella membrana. Tali pori potrebbero consentire il passaggio di molecole a basso peso molecolare prima di completare la lisi. La formazione di tali pori è stata proposta per descrivere il meccanismo di azione della magainina e della dermaseptina S (step B Figura 3B) (49).

Ulteriori studi saranno necessari per chiarire il meccanismo d'azione delle molecole antimicrobiche anche se data la loro alta variabilità di caratteristiche chimiche, struttura, attività antimicrobica e spettro d'azione, sarà difficile formulare un meccanismo d'azione generale.

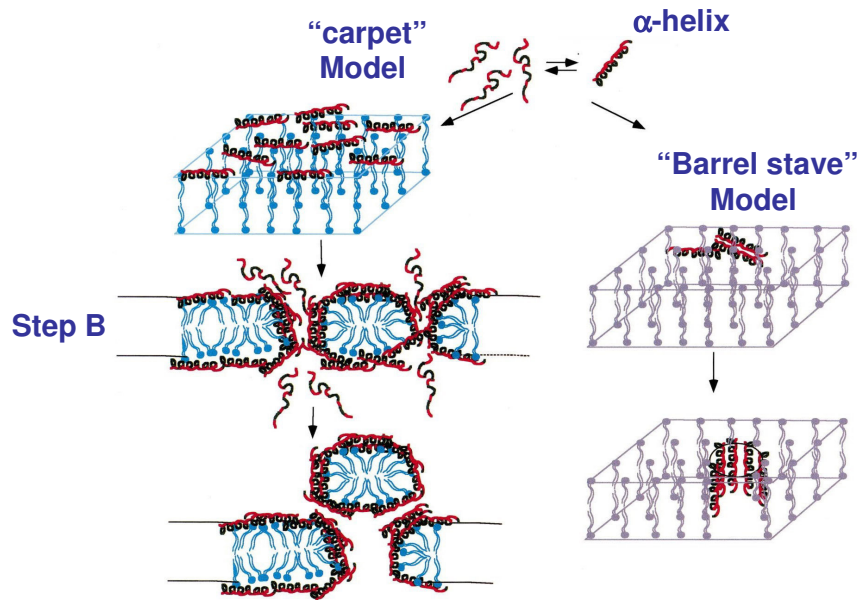
Le ricerche volte all'isolamento di nuove molecole antimicrobiche naturali sono comunque legate alla loro efficacia nelle condizioni riscontrabili negli alimenti (concentrazione salina, pH, contenuto in zuccheri) e alla loro stabilità nei processi di conservazione qualora l'obiettivo finale sia rappresentato dal loro utilizzo come conservanti.

**A)**



Brogden K.A. (2005)

**B)**



Shai Y. (1999)

### **Figura 3**

Possibili meccanismi dei peptidi antimicrobici ad azione **A)** intracellulare e **B)** litica.

## SCOPO DEL LAVORO

Obiettivo di questo lavoro di tesi è stata l'identificazione di nuove molecole con attività antimicrobica ad ampio spettro d'azione sui microrganismi patogeni che contaminano i cibi, allo scopo di utilizzarle come conservanti nei cibi per sostituire i comuni composti chimici ritenuti sempre più spesso dannosi per l'uomo.

La ricerca scientifica in tale campo è in continua evoluzione e vi sono già alcuni esempi di proteine e peptidi antimicrobici naturali con caratteristiche simili (alta basicità, struttura secondaria ad  $\alpha$  elica, ridotto peso molecolare) e di origini diverse. In letteratura sono riportati dati preliminari riguardanti alcune protammine che sembrano avere attività antibatterica su alcuni batteri Gram<sup>+</sup> e Gram<sup>-</sup>, lieviti e funghi. Il punto di partenza di questo studio sarà verificare tali risultati estendendo l'analisi dell'attività antibatterica ai batteri patogeni che più comunemente contaminano i cibi e successivamente saggiare l'attività antibatterica di nuove molecole con caratteristiche simili. Le molecole che verranno analizzate sono le protammine estratte da spermatozoi di salmone (salmina), di aringa (clupeina) e dell'anellide marino *Chaetopterus variopedatus* (*Ch.v.*), gli istoni H1 di origini diverse, polimeri di L-lisina (poly-Lys) e polimeri di L-arginina (poly-Arg). Alcune di queste molecole naturali sono da tempo oggetto di studi biochimici e biomolecolari nel laboratorio in cui è stata svolta la ricerca. Tali studi hanno portato evidenze di una diversa modalità di legame al DNA di istoni H1 spermatici e somatici come mostrato in Figura 4 in cui sono riportati saggi di ritardo della mobilità elettroforetica (EMSA) con DNA plasmidico in presenza di quantità crescenti di istoni H1 estratti da spermatozoi di *Ch.v.* e del riccio di mare *Spherechinus granularis* (*Sp.g.*) (pannello A) e degli istoni estratti da timo di vitello (C.T.) e di coniglio (R.T.) (pannello B). Tale diversità è probabilmente influenzata dal loro diverso contenuto in arginina.

I metodi per saggiare l'attività antimicrobica delle molecole sono molteplici ed in particolare in questo progetto verranno utilizzati tre diversi approcci sperimentali. Per una selezione iniziale delle molecole attive verranno effettuati saggi di diffusione radiale in terreno solido (Kirby-Bauer) mediante i quali si cercherà di individuare esclusivamente la presenza o meno di attività antibatterica. Per tali saggi sarà opportuno selezionare un ceppo batterico abbastanza sensibile in modo da poter subito eliminare le molecole non attive in quanto sarà ragionevole supporre che non mostrino attività su ceppi più resistenti.

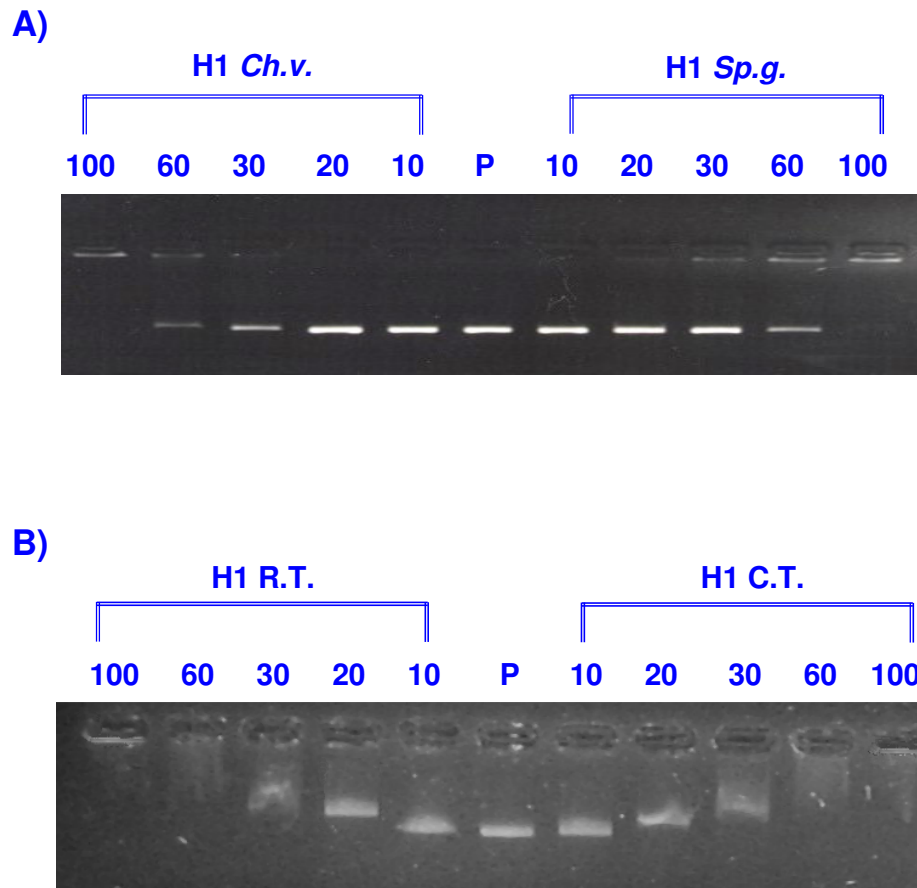
Le molecole che risulteranno attive verranno selezionate per l'analisi quantitativa dell'attività antimicrobica mediante la determinazione dei valori di concentrazione minima inibente (MIC), che corrisponde alla quantità minima di molecola che inibisce la crescita microbica, e la concentrazione minima battericida (MBC) che corrisponde alla quantità minima in cui la crescita è totalmente assente. Tali valutazioni verranno effettuate mediante due diversi saggi di attività antimicrobica: saggio delle diluizioni scalari in liquido (per determinare il valore di MIC) e in solido (per determinare il valore di MBC). I ceppi batterici su cui verrà valutata l'attività delle molecole in esame saranno i principali agenti patogeni che contaminano gli alimenti.

L'attività antibatterica delle molecole così valutata in teoria dovrebbe essere quella più corretta in quanto è misurata nelle condizioni ottimali di crescita dei batteri (sostanze nutritive, temperatura di crescita, pH, salinità, assenza di competizione microbica) però, le condizioni riscontrabili negli alimenti sono ben diverse dai terreni di coltura e possono agire sulla molecola influenzandone l'attività in modo variabile. Sarà opportuno quindi valutare l'attività antimicrobica delle molecole attive anche nelle condizioni riscontrabili negli alimenti. A tal riguardo ad esempio è stato

osservato che l'attività delle protammine, a cui si faceva riferimento in precedenza, è influenzata sia dalle condizioni di pH, sia da particolari componenti che possono essere riscontrati nei cibi, ad esempio l'EDTA che sembra aumentare l'attività di suddette molecole destabilizzando la membrana esterna dei batteri Gram<sup>+</sup>. Risulterà quindi interessante valutare ad esempio l'influenza del pH, nell'ambito dei valori riscontrabili negli alimenti (Figura 5) sull'attività antibatterica delle molecole, o anche verificare se vi possa essere sinergia di azione tra diverse molecole.

Non solo il pH, comunque rappresenta un parametro variabile nei cibi, vi sono infatti da considerare anche la concentrazione salina, la composizione dell'alimento stesso che può ad esempio essere costituito principalmente da proteine, carboidrati, o grassi che potrebbero avere effetti diversi sull'attività antibatterica. Infatti per alcune molecole è stata osservata una riduzione dell'attività in alcuni cibi ricchi in proteine e non in altri a base di zuccheri nei quali sono attualmente utilizzate come conservanti. E' evidente che la valutazione più corretta dell'attività antimicrobica delle molecole può essere ottenuta solo sperimentando le molecole direttamente sugli alimenti ma per un'analisi preliminare si potrebbe, ad esempio pensare di aggiungere gelatina, come analogo dei cibi ricchi in proteine, e verificare se influenzi l'attività antibatterica. Ai fini della realizzazione dell'obiettivo del progetto di ricerca sarebbe interessante anche valutare la stabilità delle molecole antibatteriche alle alte temperature quali quelle utilizzate nei processi di sterilizzazione dei cibi per verificare se possano essere utilizzate in associazione a tale trattamento. Un'azione sinergica di entrambi i metodi di conservazione (chimico e fisico) potrebbe garantire un'azione microbica più duratura. Per alcuni peptidi è stata osservata una stabilità termica con discreta conservazione dell'attività antimicrobica che li rende ottimi candidati per un tale utilizzo.

La possibilità di utilizzare molecole naturali come conservanti è un traguardo ancora lontano soprattutto per le difficoltà che si riscontrano nel cercare di comprendere il loro meccanismo d'azione, rendendo difficile prevederne il comportamento all'interno dell'organismo. A tal riguardo il settore scientifico è in fervente attività per cercare di chiarire il meccanismo ai fini di una corretta valutazione della non tossicità per l'uomo e di una possibile ottimizzazione dell'attività antimicrobica. Risulterà quindi interessante cercare di capire come potrebbero agire le molecole saggiate in tale studio ad esempio modificandole chimicamente nei residui amminoacidici che potrebbero essere critici per l'eventuale attività antibatterica (lisine e arginine) e valutarne l'effetto cercando soprattutto di chiarire l'importanza delle interazioni elettrostatiche con la cellula bersaglio; si potrà inoltre verificare se si tratta di un'azione antibatterica a livello di membrana, con conseguente lisi cellulare o se vi sia un bersaglio interno alla cellula con il quale la molecola interagisca interferendo con processi vitali.

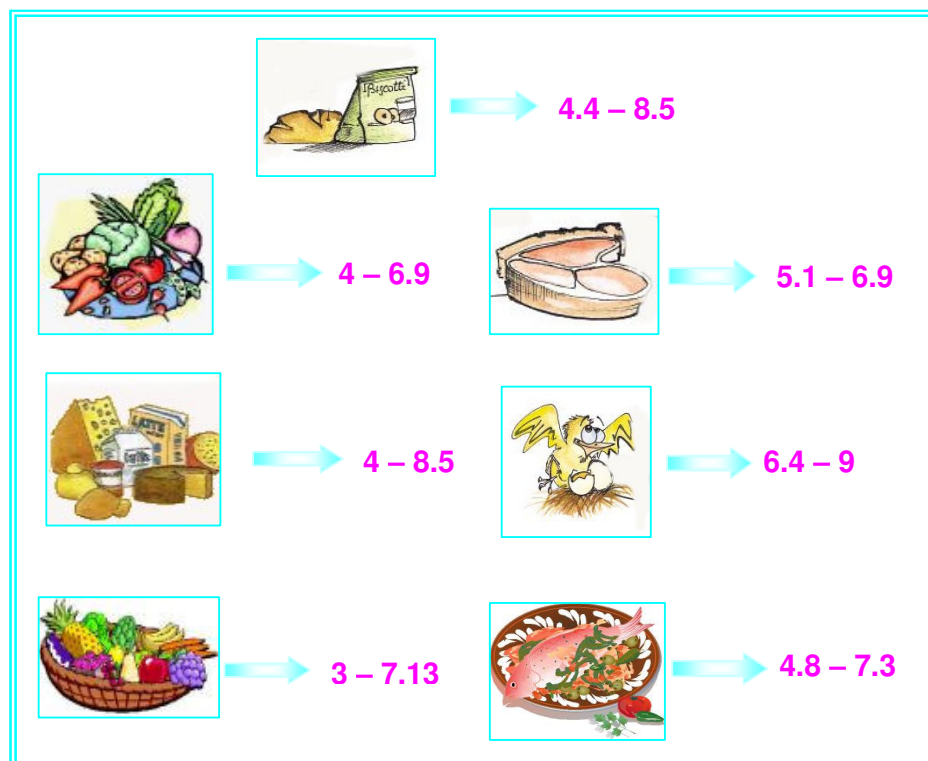


**Figura 4**

EMSA su gel di agarosio 1,8% dei campioni di DNA plasmidico pGEM3 in presenza di quantità crescenti di istone H1 di *Ch.v.* e di *Sp.g.*(**A**) e di C.T. e R.T. (**B**) nei rapporti percentuali (w/w) H1/DNA: 10, 20, 30, 60, 100. P: pGEM3 in assenza di proteina.



## Valori di pH riscontrabili negli alimenti



**Figura 5**

Valori di pH riscontrabili negli alimenti

## MATERIALI E METODI

### CEPPI BATTERICI

I ceppi batterici utilizzati in questo progetto di ricerca e riportati nella seguente tabella, sono stati forniti dal Prof. Aliberti del Dipartimento delle Scienze Biologiche dell'Università di Napoli Federico II:

<b><u>Tabella 3</u></b>		
<b>Ceppi batterici</b>	<b>Reazione di Gram</b>	<b>Origine</b>
<i>B. subtilis</i> 6633	+	ATCC, batteri sporigeni
<i>B. cereus</i> 11778	+	ATCC, patogeno sporigeno
<i>L. monocytogenes</i> 7644	+	ATCC, patogeno
<i>S. aureus</i> 25923	+	ATCC, patogeno
<i>E. coli</i> O157:H7 35150	-	ATCC, patogeno
<i>S. typhimurium</i> 14098	-	ATCC, patogeno
<i>S. sonnei</i> 25931	-	ATCC, patogeno
<i>P. aeruginosa</i> 27853	-	ATCC, patogeno

### TERRENI DI COLTURA

I ceppi batterici sono stati cresciuti in terreno Nutrient Broth (polvere Lab-Lemco 0.001%, estratto di lievito 0,002 %, peptone 0,005 %, cloruro di sodio 0,005%) e conservati su terreno Mueller Hinton Agar (Composizione (g/litro): estratto di carne 2,0; idrolisato di caseina 17,5; amido 1,5; agar-agar 13).

### MOLECOLE SAGGIATE

Le proteine basiche totali di spermi di *Ch.v.* erano già disponibili nel laboratorio in cui è stato svolto il lavoro di tesi e conservate sotto forma di liofilizzato per cui l'istone H1 e la protamina sono stati separati come riportato nella successiva sezione.

La salmina, salmina solfato, clupeina solfato, l'istone H1 di timo di vitello (C.T.), l' $\alpha$ -poly-L-lisina (poly-Lys) e l' $\alpha$ -poly-L-arginina (poly-Arg) sono stati acquistati alla SIGMA. La poly-Lys e la poly-Arg hanno un peso molecolare di 14000 Da.

### DETERMINAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE PROTEICA

La concentrazione proteica è stata determinata col metodo del Blue Coomassie (50), realizzato mediante l'utilizzo del reagente Bio-Rad Protein Assay (BioRad Laboratories) utilizzando come molecola di riferimento per la costruzione della retta di taratura l'istone H1 di C.T. (o le protamine) sciolto direttamente nella confezione

acquistata alla SIGMA. L'istone H1 e la protamina di *Ch.v.* nativi sono stati utilizzati come riferimento per le molecole modificate.

#### **FRAZIONAMENTO DELL'ISTONE H1 E DELLA PROTAMMINA DI *CH.V.***

Il frazionamento dell'istone H1 e della protamina di *Ch.v.* è stato effettuato mediante cromatografia a scambio ionico su colonna di Carbossimetil-cellulosa Whatman CM-52 delle dimensioni di  $\Phi = 1 \text{ cm} \times h = 10 \text{ cm}$  corrispondenti ad un volume di circa 8 mL. La cellulosa si prepara rigonfiandola ed equilibrandola con un tampone 50 mM Na-Acetato pH 4.5. Prima di impaccare la colonna la cellulosa viene equilibrata nello stesso tampone a cui è stata aggiunta urea 6M, risospingendola e lasciandola sedimentare per 3 o 4 volte. La colonna viene impaccata dopo aver provveduto a degassare la cellulosa sotto vuoto con pompa meccanica.

75 mg di proteine liofilizzate si sciolgono in 4 mL di 50 mM Na-Acetato pH 4.5 contenente urea 6M e si dializzano contro lo stesso tampone finché la soluzione proteica raggiunge gli stessi valori di pH e forza ionica del tampone. La soluzione di proteine basiche viene caricata su colonna con un flusso di 12 mL/h. La colonna viene poi lavata con 16 mL di 50mM Na-Acetato pH 4.5, urea 6M, per eliminare quella parte di proteine che non si è legata alla cellulosa. Le proteine vengono quindi eluite in maniera selettiva con un gradiente di forza ionica costituito dalle seguenti soluzioni: 150 mL 0,05M Na-Acetato, 6M urea, 0,2M NaCl, pH 4,5; 150 mL 0,05M Na-Acetato, 6M urea, 0,6M NaCl, pH 4,5. Il flusso di eluizione della colonna viene mantenuto costante ad un valore di 15 mL/h mediante l'uso di una pompa peristaltica; si raccolgono frazioni da 2 mL con collettore di frazioni. Il profilo di eluizione si ottiene determinando l'assorbanza a 230 nm di ogni frazione perché la protamina non ha assorbanza nella zona delle catene laterali aromatiche e quindi l'assorbimento di luce UV viene fatto nella zona dei legami peptidici. Le frazioni corrispondenti ai vari picchi si raccolgono separatamente e vengono successivamente precipitate con 3 volumi di acetone precedentemente tenuto a  $-20^{\circ}\text{C}$ , tenendo le sospensioni a  $-20^{\circ}\text{C}$  per tutta la notte. Il precipitato ottenuto centrifugando la sospensione a  $4^{\circ}\text{C}$  a 10000 rpm per 15 minuti viene sciolto in un piccolo volume di acqua distillata, e viene poi dializzato contro acqua per rimuovere i sali e l'acetone residui. Da questa soluzione le proteine vengono liofilizzate e conservate in un essiccatore a  $4^{\circ}\text{C}$ .

#### **SAGGIO DI DIFFUSIONE RADIALE IN TERRENO SOLIDO (KIRBY BAUER)**

L'attività antibatterica di istoni, protammine e polimeri di sintesi è stata misurata mediante un saggio di diffusione radiale (Kirby-Bauer) in terreno di coltura Mueller Hinton agar su *B. subtilis*. 10 ml di terreno Mueller Hinton agar sono stati inoculati con 1 ml ( $\sim 10^6$  U.F.C./ml) del ceppo batterico selezionato secondo la tecnica dell'inclusione. Dischetti di carta da filtro ( $\phi = 6 \text{ mm}$ ), contenenti 10  $\mu\text{l}$  dell'agente antimicrobico, ad una concentrazione compresa tra 5 e 0,05 mg/ml, sono stati disposti direttamente sul terreno inoculato. Dopo 24 ore di incubazione a  $37^{\circ}\text{C}$  le piastre vengono analizzate per la presenza di aloni di inibizione della crescita batterica, che indicano la sensibilità del batterio alla molecola saggiata. L'ampicillina è stata utilizzata come controllo positivo. Tutti i saggi sono stati condotti in quadruplicato.

## **DEGUANIDINAZIONE DELLE ARGININE DI ISTONI E PROTAMMINE**

La deguanidinazione delle arginine, con formazione di ornitine, è stata condotta con il metodo descritto da Carr et al. (51), cui sono state apportate delle modifiche.

A 100  $\mu$ L della soluzione proteica 10 mg/mL si aggiungono 100  $\mu$ L di idrazina (50% finale). Si incuba il campione a 75°C per 15" per l'istone H1 di *Ch.v.*, per 30" per l'istone H1 C.T. e per la clupeina e per 60' per la protammina di *Ch.v.*. Al termine della reazione i campioni sono congelati a -80°C per bloccare la reazione ed essiccati in un concentratore sotto vuoto Savant per allontanare l'ammoniaca prodotta dalla reazione di deguanidinazione e l'idrazina che non ha reagito. Successivamente i campioni vengono risospesi in 100  $\mu$ L di ddH<sub>2</sub>O sterile ed essiccati nuovamente. Il procedimento viene ripetuto 3 volte, al termine i campioni vengono risospesi in 300  $\mu$ L di ddH<sub>2</sub>O. Per l'utilizzo delle molecole deguanidinate nei saggi di diluizioni scalari in terreno liquido e per la preparazione del filtrato dell'istone H1 di C.T. la quantità di molecola di partenza è maggiore di 1 mg ma la reazione è stata condotta come descritto rispettando tutti i rapporti di proporzionalità del reagente e dei lavaggi.

## **MODIFICA DELLE LISINE DELLA PROTAMMINA DI *CH.V.***

I residui di lisina della protammina di *Ch.v.* sono stati modificati sia per acetilazione che per succinilazione. 1 mg di proteina sciolto in 100  $\mu$ L di ddH<sub>2</sub>O sterile si stratifica su 1 mL di una miscela di cloroformio-diossano (1:2) contenente anidride acetica (50 mg/mL), nel caso dell'acetilazione, oppure anidride succinica (25 mg/mL), nel caso della succinilazione. Le reazioni, che avvengono all'interfaccia tra acqua e solvente organico, sono condotte a temperatura ambiente, senza agitazione, per 16 h circa. Al termine, la fase acquosa di ciascuna preparazione, contenente la proteina modificata, viene recuperata, diluita fino ad 1 mL con ddH<sub>2</sub>O sterile e dializzata contro acqua distillata.

## **SAGGIO DI DETERMINAZIONE DEI GRUPPI AMMINICI LIBERI**

I gruppi amminici liberi sono stati titolati con l'acido 2,4,6-trinitrobenzensolfonico (52) secondo il seguente protocollo:

Alla soluzione proteica (100  $\mu$ g) in 1 mL di tetraborato di sodio 0,1 N si aggiungono 200  $\mu$ L di acido trinitrobenzensolfonico 1,5 mM e la miscela è incubata a 37°C per 30' in una provetta protetta dalla luce. La reazione è bloccata mediante l'aggiunta di 2 mL di acido formico. La percentuale di gruppi amminici liberi è determinata dall'assorbanza a 340 nm utilizzando come molecola standard l'RNasi A (che ha 11 amminogruppi liberi per molecola).

## **PREPARAZIONE FILTRATO H1 DI C.T.**

L'istone H1 di C.T. deguanidinato è stato filtrato su filtri Millipore con cut off 3000 Da e la frazione filtrata è stata analizzata in SDS-PAGE preparato secondo la metodica descritta da Laemmli (53) con gel di separazione al 18% di poliaccrilammide e gel d'impaccamento al 6% e successiva colorazione con nitrato d'argento.

#### **CROMATOGRAFIA A FASE INVERSA PER HPLC (RP-HPLC) ANALITICA E PREPARATIVA DEL FILTRATO DERIVATO DALL'ISTONE H1 DI C.T.**

Il filtrato ottenuto dalla deguanidinazione di 4 mg di istone H1 di C.T. è stato analizzato su cromatografia a fase inversa per HPLC (RP-HPLC) analitica (Shimadzu LC-10 ADVP) su colonna da 0,5 cm, resina C18, flusso 1ml/min e con un gradiente di acetonitrile dal 5% al 95% in 0.1% TFA ed il profilo di eluizione è stato seguito monitorando l'assorbimento dell'eluato a 210 nm. L'eluizione è stata condotta utilizzando il seguente gradiente lineare: 5 min acetonitrile 5%, 30 minuti da 5% a 70% acetonitrile, 5 minuti dal 70% al 95% acetonitrile. Lo stesso procedimento è stato ripetuto per il filtrato ottenuto da 8 mg, 20 mg e da 40 mg di istone H1 di C.T. deguanidinato. Dopo aver analizzato la composizione dei filtrati su RP-HPLC analitica si è proceduto alla purificazione dei prodotti presenti nei filtrati mediante RP-HPLC preparativo (Shimadzu LC-8) su colonna da 1 cm x 25 cm e resina C18, con flusso 5 ml/min, utilizzando lo stesso gradiente dell'HPLC analitico ma scalato di 1,16 volte nel tempo. Il profilo cromatografico è stato seguito monitorando l'assorbimento dell'eluato a 210 nm.

#### **SAGGIO DI DILUIZIONI SCALARI IN TERRENO LIQUIDO**

I saggi di diluizioni scalari in liquido sono stati effettuati in tubi di coltura contenenti Nutrient Broth inoculato con  $10 \mu\text{l}$  di  $\approx 1 \times 10^6$  U.F.C. /ml del ceppo batterico (Tabella 3) in presenza della molecola antimicrobica in un intervallo di concentrazione compreso tra 2 e 0,007 mg/ml. I tubi sono stati incubati per 24 h a 37°C e la crescita batterica visibile è stata registrata. La Minima Concentrazione Inibente (MIC) è stata definita come la concentrazione più bassa di molecola antimicrobica alla quale non vi è crescita batterica visibile. Ogni esperimento è stato ripetuto tre volte.

#### **SAGGIO DELLE DILUIZIONI SCALARI IN SOLIDO**

Dopo aver valutato i valori di MIC le colture batteriche sono state piastrate su un terreno solido (Mueller Hinton agar) privo dell'agente antimicrobico ed incubate a 37°C per 24 ore per stimare la sopravvivenza batterica; su questa base la Minima Concentrazione Battericida (MBC) è stata misurata come la più bassa concentrazione di molecola antibatterica che risulta in una totale assenza di crescita batterica. Ogni esperimento è stato ripetuto tre volte.

#### **EFFETTO DEL pH SULL'ATTIVITÀ ANTIBATTERICA DI SALMINA E SALMINA SOLFATO**

L'effetto del pH sull'attività antibatterica della salmina e della salmina solfato è stato determinato portando il pH del terreno di coltura, nel saggio di diluizioni scalari in liquido a valori di 4, 6 e 8 e valutando il valore della MIC. Il saggio in solido per determinare l'MBC è stato condotto come descritto in precedenza. Tali analisi sono state condotte su tutti i ceppi batterici indicati in Tabella 3. L'esperimento è stato ripetuto tre volte.

#### **EFFETTO DELLA TEMPERATURA SULL'ATTIVITA' ANTIBATTERICA DI POLY-ARG**

L'effetto della temperatura sui valori della MIC ed della MBC di poly-Arg è stato determinato riscaldando la poly-Arg per 20 minuti a 120°C in autoclave per utilizzarla nei saggi in liquido e solido descritti in precedenza, su tutti i ceppi batterici riportati in Tabella 3. L'esperimento è stato ripetuto tre volte.

#### **EFFETTO DELLA GELATINA SULL'ATTIVITA' ANTIBATTERICA DI POLY-ARG**

Per le analisi preliminari dell'influenza della gelatina sull'attività antibatterica di poly-Arg è stata aggiunta Gelatina di tipo A estratta dalla pelle di suino (pI=7-9; SIGMA) ad una concentrazione finale del 5% in Nutrient Broth solo nei saggi di diluizioni in liquido a cui sono seguiti i saggi in solido come riportato in precedenza. Tali analisi sono state condotte su tutti i ceppi escluso *L. monocytogenes* e *S. aureus*.

#### **PREPARAZIONE DI MISCELE POLY-ARG E POLY-LYS**

Tali miscele sono state preparate facendo interagire poly-Arg e poly-Lys in rapporti in peso poly-Arg:poly-Lys 1:1. Le soluzioni sono state incubate per tutta la notte a temperatura ambiente in NaCl 0,1 M e Tris-HCl 10 mM pH 7.5. Stesso trattamento è stato effettuato sui polimeri singolarmente. Di tali molecole è stato misurato il valore di MBC su *B.cereus* ed *E.coli O157:H7*.

#### **REAZIONE DI MARCATURA DI POLY-ARG CON DEAC,SE**

La reazione di marcatura di poly-Arg è stata effettuata con 7-Diethylaminocoumarin-3-carboxylic acid, succinimidyl ester (DEAC,SE Anaspec;  $\lambda_{abs}= 433$  nm e  $\lambda_{em}= 472$  nm ). 5 mg di poly-Arg sono stati sciolti in 1 ml di acqua ed è stato aggiunto il DEAC,SE in un rapporto molare 1:1. La reazione è stata condotta in HEPES 100 mM finale a pH 7.5 in vial protetta dalla luce, sotto agitazione magnetica a temperatura ambiente. Sono stati fatti prelievi di 10  $\mu$ l a tempo zero, dopo 20 minuti e dopo due ore e sono stati analizzati su RP-HPLC analitica per seguire l'andamento della reazione. Risultando la reazione troppo lenta sono stati aggiunti altri 2 equivalenti di fluoroforo e la reazione è stata lasciata proseguire overnight e in tali condizioni la reazione di marcatura è andata a compimento (Figura 19). La purificazione del prodotto di reazione è stata effettuata su RP-HPLC preparativa (Figura 20) e le frazioni con i tempi di ritenzione compresi tra 14 e 16 minuti sono state raccolte, unite, liofilizzate e risospese in 1 ml di ddH<sub>2</sub>O.

L'RP-HPLC analitica e preparativa sono gli stessi descritti in precedenza, il gradiente utilizzato per l'eluizione della poly-Arg coniugata al fluoroforo è stato il seguente: 20% acetonitrile in 0.1% TFA per 5 minuti, dal 20% all'80% in 20 minuti, lavaggi per 5 minuti a 95% acetonitrile e ritorno in 5 minuti nelle condizioni iniziali. I profili cromatografici sono stati seguiti monitorando l'assorbimento dell'eluato a 210 nm. RP-HPLC analitici sono stati effettuati anche con la poly-Arg e il fluoroforo singolarmente.

## MICROSCOPIA A FLUORESCENZA

Il complesso poly-Arg [DEAC,SE] è stato aggiunto agli inoculi di *B. cereus* ed *E. coli* O157:H7 a concentrazione sub letale (0,125 mg/ml) ed incubato per 24 ore a 37°C. Le cellule sono state poi lavate con il terreno di coltura per rimuovere l'eccesso di fluoroforo, montate su vetrini e osservate al microscopio a fluorescenza (Nikon Eclipse 1000) con un obiettivo 100X ad immersione (ingrandimento ocularexobiettivo=1000). Trattamento analogo è stato effettuato utilizzando il 4', 6-diamino-2-phenylindole (DAPI) per colorare il DNA ( $\lambda_{\text{abs}} = 358 \text{ nm}$  e  $\lambda_{\text{em}} = 461 \text{ nm}$ ). DEAC,SE da solo è stato aggiunto sia all'inoculo di *B. cereus* che a quello di *E. coli* O157:H7 come controllo negativo.

## SAGGI EMSA

Il saggio EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) si basa sul fenomeno di cambiamento di mobilità elettroforetica che una banda di DNA su gel di agarosio o di acrilammide mostra quando è legata ad una proteina. Si è osservato che un frammento di DNA che abbia legato a sé dei fattori proteici migra più lentamente. Questa metodica viene quindi utilizzata per analizzare l'interazione tra DNA e molecole ligandi. Per questo motivo è necessario che le condizioni di elettroforesi non siano denaturanti. Pertanto i campioni sono stati analizzati in tampone TBE. A 600 ng di DNA del plasmide pGEM3, linearizzato con l'enzima SmaI, vengono aggiunte quantità crescenti di istone H1 di *Ch.v.* o di C.T. o delle protammine o di poly-Lys o poly-Arg. Il volume dei campioni è 30  $\mu\text{l}$ . Le proteine vengono aggiunte con rapporti percentuali (w/w) istone /DNA che variano da 0 a 100 e protamina (o polimeri di sintesi o molecole modificate)/DNA da 0 a 200. Le miscele vengono incubate a T ambiente per 5 min prima dell'aggiunta di TBE 1X, ed incubate per 10 minuti. Successivamente si aggiungono 3  $\mu\text{l}$  di una soluzione contenente 50% glicerolo, per appesantirle, e 0,42% Xilene Cianolo, 0,42% Blu di Bromofenolo come indicatori di corsa. Negli esperimenti descritti i gel sono all'1,8% agarosio. La corsa elettroforetica viene condotta a 100 volt costanti in cella orizzontale (13,5 cm x 20 cm) a T ambiente, in tampone TBE 1X. La migrazione elettroforetica dura 120 min e al termine il gel viene immerso in una soluzione di EtBr 2  $\mu\text{g/ml}$  e lasciato in leggera agitazione per 40 min. Al termine il gel viene lavato ripetutamente con acqua distillata per eliminare l'eccesso di EtBr. La presenza di bande fluorescenti permette di individuare la posizione del DNA sul gel. Per gli EMSA condotti utilizzando il DNA genomico sonicato di *E.coli* (SIGMA) la procedura sperimentale è la stessa però i campioni sono preparati con 1  $\mu\text{g}$  di DNA e con poly-Arg (o istone H1 di C.T.) in rapporti percentuali (w/w) poly-Arg (o istone H1)/DNA che variano da 0 a 400. Il gel d'agarosio utilizzato è all'1%.

## RISULTATI

### SAGGI DI ATTIVITÀ ANTIBATTERICA

#### SAGGI DI DIFFUSIONE RADIALE IN TERRENO SOLIDO (KIRBY BAUER)

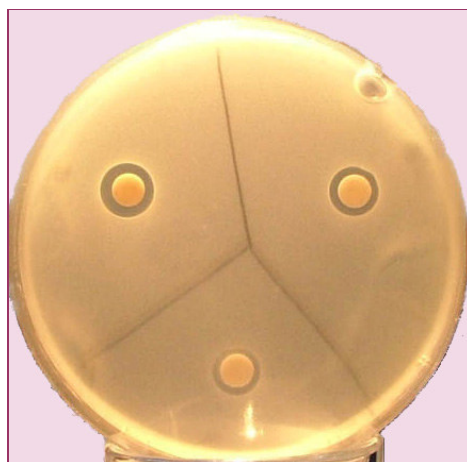
Lo studio dell'attività antibatterica delle molecole utilizzate per questo progetto di ricerca è stato effettuato in prima analisi mediante saggi di diffusione radiale in terreno solido (Kirby Bauer) su *Bacillus subtilis*, un batterio Gram<sup>+</sup> molto sensibile alla presenza di sostanze tossiche in modo da selezionare rapidamente le molecole attive. I risultati ottenuti, valutando la presenza e le dimensioni degli aloni di inibizione della crescita batterica, hanno mostrato che salmina solfato e poly-Lys sono attivi a quantità non inferiori ai 10 µg, poly-Arg ai 20 µg (Figura 6A) mentre l'istone H1 di *Ch.v.*, la clupeina solfato (Figura 6B) e la protammina di *Ch.v.* (Figura 7A) sono attivi a quantità non inferiori ai 50 µg. L'istone H1 di C.T. sembra non avere alcuna attività (Figura 6A). La protammina e l'istone H1 di *Ch.v.*, l'istone H1 di C.T. e la clupeina solfato sono state modificate per deguanidazione, con idrazina idrata, in modo da convertire parte delle arginine in ornitine, e sono state utilizzate nei saggi Kirby Bauer su *B. subtilis*. La protammina di *Ch.v.* deguanidinata ha mostrato attività antibatterica già a 10 µg (Figura 7A) risultando più efficiente della molecola nativa; i derivati deguanidinati dell'istone H1 di C.T. hanno mostrato attività a 50 µg, così come i derivati dell'H1 di *Ch.v.* e della clupeina che hanno quindi mantenuto la stessa attività delle molecole native con la differenza che l'alone di inibizione della crescita è più grande di quello delle molecole native. L'attività antibatterica della clupeina deguanidinata è risultata inoltre maggiore di quella degli istoni H1 deguanidinati che mostrano attività molto simile tra loro in termini di dimensioni dell'alone di inibizione (Figura 7B).

La protammina di *Ch.v.* è stata inoltre modificata per acetilazione e succinilazione per bloccare le lisine ed i derivati così modificati hanno mostrato attività simile alla protammina nativa (Figura 8). Allo scopo di valutare l'effetto delle diverse modifiche chimiche sono stati misurati i restanti gruppi amminici liberi sulle molecole modificate. Come si può notare le modifiche per acetilazione e succinilazione sono quelle più efficienti (Tabella 4).



**A)**

**Poly-Arg**

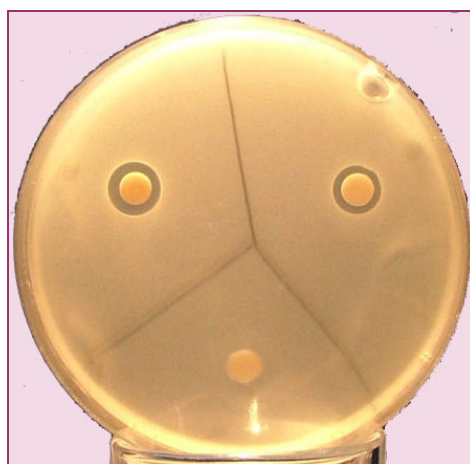


**Poly-Lys**

**Salmina  
solfato**

**B)**

**Clupeina  
solfato**



**H1 *Ch.v.***

**H1 C.T.**

**Figura 6**

Saggi di attività antimicrobica (Kirby Bauer) su *B.subtilis* in presenza di:

**A)** 10 µg di salmina solfato e poly-Lys, 20 µg di poly-Arg

**B)** 50 µg di clupeina solfato, istoni H1 di *Ch.v.* e di C.T.



**Figura 7**

Saggi di attività antimicrobica (Kirby Bauer) su *B.subtilis* in presenza di:

**A)** 50 µg di protamina di *Ch.v.* nativa e 10 µg di deguanidinata

**B)** 50 µg di clupeina solfato, istoni H1 di *Ch.v.* e di C.T. deguanidinati



**Figura 8**

Saggio di attività antimicrobica (Kirby Bauer) su *B.subtilis* in presenza di 50 µg di protamina di *Ch.v.* succinilata e acetilata

<b><u>Tabella 4</u></b>			
	% Modifica		
Molecole	Deguanidinato	Acetilato	Succinilato
Protamina <i>Ch.v.</i>	50%	89.5%	87.5%
Istone H1 <i>Ch.v.</i>	31%	-	-
Istone H1 C.T.	30%	-	-
Clupeina solfato	30%	-	-

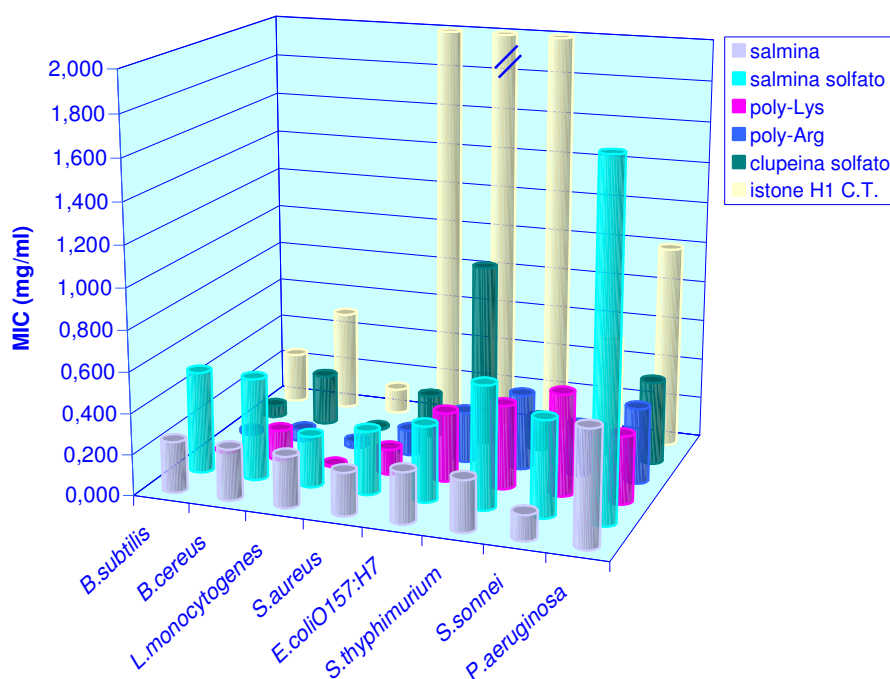
## SAGGIO DI DILUIZIONI SCALARI IN LIQUIDO

I saggi di attività antimicrobica in terreno liquido, per determinare i valori di Minima Concentrazione Inibente (MIC) delle molecole selezionate, condotti sui principali batteri patogeni che contaminano i cibi, hanno mostrato che la crescita di tutti i ceppi batterici è inibita dalla presenza delle molecole saggate con valori di MIC che variano da 2 a 0,007 mg/ml come riportato in Tabella 5 e nell'istogramma di Figura 9. La salmina è risultata più efficiente della salmina solfato eccetto su *L. monocytogenes* su cui l'attività delle due molecole risulta simile. La clupeina solfato, simile alla salmina e alla salmina solfato, ha mostrato attività antibatterica paragonabile sulla maggior parte dei ceppi con una maggiore efficienza su *B. subtilis* e *L. monocytogenes*. La poly-Arg e la poly-Lys sono risultate molto efficienti con valori di MIC che variano tra 0,015 e 0,37 mg/ml e tra 0,007 e 0,5 mg/ml rispettivamente. L'istone H1 di C.T. ha mostrato valori di MIC compresi tra 0,125 e 2 mg/ml risultando poco efficiente sui Gram<sup>-</sup>.

<u>Tabella 5</u>	MIC mg/ml					
Ceppi batterici	Salmina solfato	Clupeina solfato	Salmina	Poly-Arg	Poly-Lys	Istone H1 C.T.
<i>B. subtilis</i>	0,5	0,060	0,250	0,015	0,007	0,25
<i>B. cereus</i>	0,500	0,250	0,250	0,06	0,150	0,5
<i>L. monocyt.</i>	0,250	0,007	0,250	0,03	0,007	0,125
<i>S. aureus</i>	0,31	0,21	0,21	0,125	0,125	2
<i>E. coli O157:H7</i>	0,37	0,9	0,250	0,25	0,34	2
<i>S. thyphim.</i>	0,6	0,160	0,250	0,37	0,41	>2
<i>S. sonnei</i>	0,47	0,145	0,125	0,25	0,5	0,5
<i>P. aeruginosa</i>	1,7	0,41	0,56	0,37	0,33	1

## SAGGIO DI DILUIZIONI SCALARI IN SOLIDO

I saggi di diluizioni scalari in terreno solido, per determinare i valori di Minima Concentrazione Battericida (MBC) delle molecole selezionate, hanno permesso di verificare se l'azione di tali molecole sui ceppi batterici fosse battericida, o solo inibente. Tutte le molecole hanno mostrato attività battericida su tutti i ceppi selezionati con valori di MBC che variano da 2 a 0,007 mg/ml, come riportato in Tabella 6 e in Figura 10. La salmina è risultata più efficiente della salmina solfato indicando che i gruppi solfato potrebbero neutralizzare alcune cariche positive riducendo l'attività antibatterica. I valori di MBC della clupeina solfato variano da 1,5 a 0,098 mg/ml.



**Figura 9**

Istogramma dei valori di MIC (mg/ml) delle molecole antibatteriche.

La poly-Lys e la poly-Arg hanno mostrato attività antibatterica simile con valori di MBC che variano da 1 a 0,007 mg/ml, risultando, con la salmina, le molecole più efficienti sulla maggior parte dei ceppi batterici saggiate soprattutto sui batteri Gram<sup>+</sup> rispetto ai Gram<sup>-</sup> probabilmente per la minore affinità di tali molecole verso la membrana esterna dei Gram<sup>-</sup>. L'istone H1 di C.T. ha mostrato valori di MBC più alti delle altre molecole sulla maggior parte dei ceppi. Il valore di MBC misurato per la miscela costituita da poly-Lys e poly-Arg, in rapporto in peso 1:1 in NaCl 100 mM e Tris-HCl 10 mM pH 7,4, su *B.cereus* è risultata essere di 0,18 mg/ml, più bassa delle singole molecole saggiate sia in acqua sia nelle condizioni della miscela (Tabella 7) e questo potrebbe indicare una loro probabile sinergia. Stesso esperimento condotto su *E.coli* O157:H7 ha invece mostrato un comportamento totalmente diverso in

quanto i valori di MBC della miscela poly-Arg e poly-Lys e delle singole molecole nelle stesse condizioni (Tabella 7) risultano più alti di quelli misurati in acqua (Tabella 6).

I saggi di attività antimicrobica hanno indicato che il peso molecolare delle molecole potrebbe non essere un parametro critico per l'attività antibatterica poiché le molecole saggiate, variando da 4000 Da di salmina e clupeina, a 14000 Da dei polimeri di sintesi, hanno mostrato attività simile.

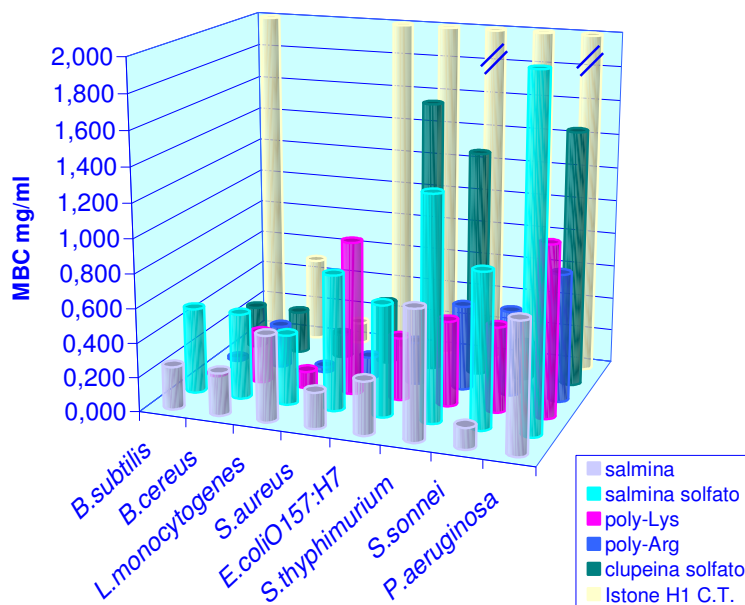
<u>Tabella 6</u>	MBC mg/ml					
Ceppi batterici	Salmina solfato	Clupeina solfato	Salmina	Poly-Arg	Poly-Lys	Istone H1 C.T.
<i>B. subtilis</i>	0,50	0,25	0,25	0,015	0,007	2
<i>B. cereus</i>	0,50	0,25	0,25	0,25	0,30	0,5
<i>L. monocyt.</i>	0,41	0,098	0,50	0,03	0,007	0,125
<i>S. aureus</i>	0,79	0,90	0,21	0,125	0,125	2
<i>E. coli O157:H7</i>	0,65	1,6	0,31	0,25	0,37	2
<i>S. thyphim.</i>	1,3	1,33	0,75	0,50	0,50	>2
<i>S. sonnei</i>	0,90	0,21	0,125	0,50	0,50	2
<i>P. aeruginosa</i>	2	1,50	0,75	0,75	1	>2

<u>Tabella 7</u>	MBC mg/ml		
Ceppi batterici	Poly-Lys *	Poly-Arg *	Poly-Lys + Poly-Arg *
<i>B. cereus</i>	0,25	0,18	0,18
<i>E. coli O157H:7</i>	0,50	0,50	0,60
*Tris HCl 10mM e NaCl 0,1 M			

#### EFFETTO DEL pH SULL'ATTIVITÀ ANTIBATTERICA DI SALMINA E SALMINA SOLFATO

Allo scopo di verificare quali fossero le condizioni ottimali per un'efficace attività antibatterica sono stati valutati i valori di MBC di salmina e salmina solfato su ciascun ceppo al variare del pH del terreno. I valori di pH scelti sono stati tra 4 e 8 in quanto rispecchiano le condizioni riscontrabili negli alimenti. Nelle Figure 11 e 12 sono

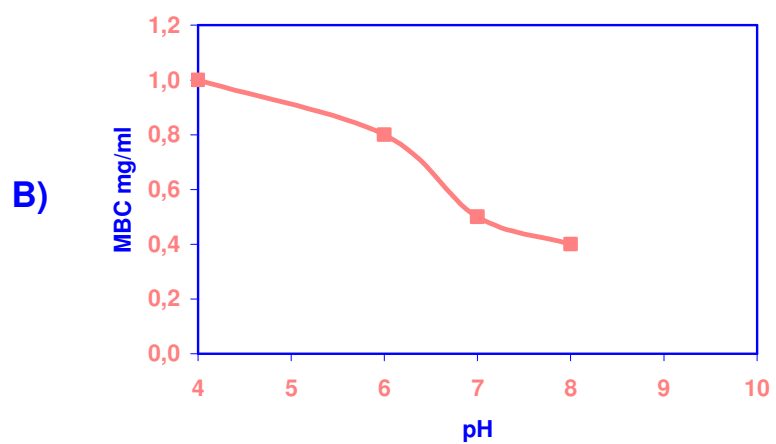
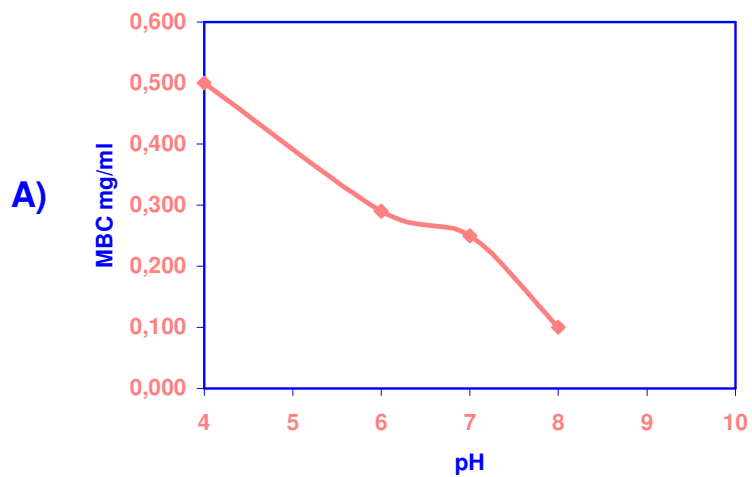
riportati i grafici della relazione tra pH e MBC di salmina e salmina solfato per *B.cereus* ed *E.coli* O157:H7, come esempi rispettivamente di batteri Gram<sup>+</sup> e Gram<sup>-</sup>, in quanto l'andamento è simile anche per gli altri ceppi analizzati.



**Figura 10**

Istogramma dei valori di MBC (mg/ml) delle molecole antibatteriche.

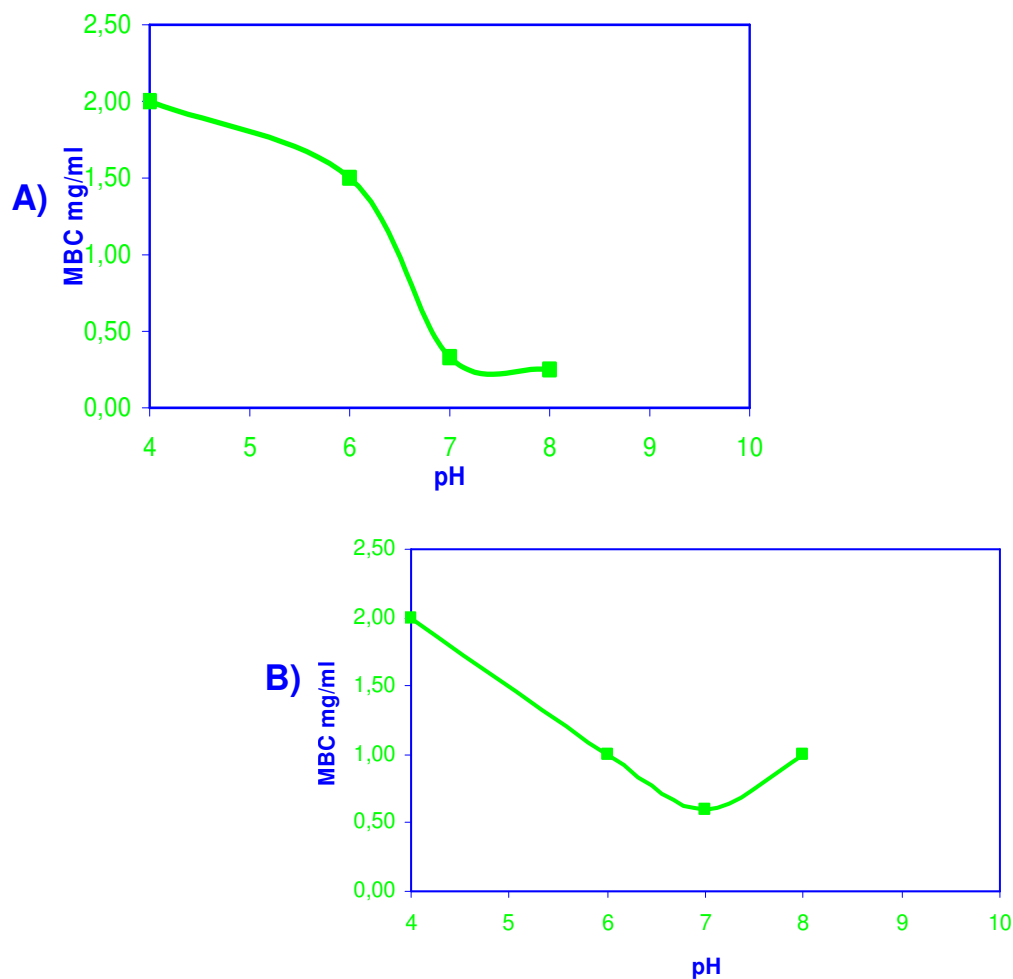
Entrambe le molecole conservano l'attività antibatterica in tutto l'intervallo di pH mostrando un optimum di attività a pH compreso tra 7 e 8 per la maggior parte dei ceppi, solo per *L. monocytogenes* e *P. aeruginosa* i dati non sono significativi. Avendo verificato che le condizioni di pH esaminate non hanno effetto sulla crescita batterica, probabilmente potrebbero influenzare le caratteristiche chimiche della membrana cellulare e favorire l'interazione con le molecole antibatteriche.



**Figura 11**

Effetto del pH sull'attività antibatterica della salmina (**A**) e della salmina solfato (**B**) su *B.cereus*.





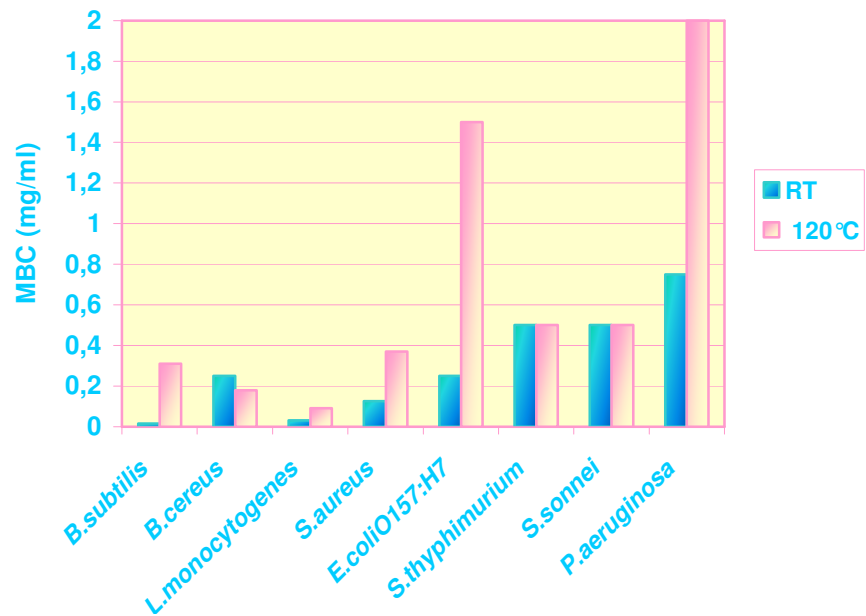
**Figura 12**

Effetto del pH sull'attività antibatterica della salmina (**A**) e della salmina solfato (**B**) su *E.coli* O157:H7.

#### **EFFETTO DELLA TEMPERATURA SULL'ATTIVITÀ ANTIBATTERICA DI POLY-ARG**

Un altro parametro importante per l'utilizzo di tali molecole come conservanti nei cibi è l'effetto della temperatura sull'attività antibatterica in quanto, come è noto, spesso gli alimenti vengono sottoposti a trattamenti termici per impedire la crescita microbica indesiderata. A tale scopo l'MBC della poly-Arg è stata misurata dopo aver riscaldato la molecola in autoclave per 20 minuti. Come riportato in Figura 13 la poly-Arg conserva la sua attività antibatterica su tutti i ceppi batterici sebbene i valori di MBC

sono risultati, in quasi tutti i casi, più alti di quelli ottenuti con la molecola non sottoposta al calore.



**Figura 13**

Effetto della temperatura sull'attività antibatterica di poly-Arg.

#### EFFETTO DELLA GELATINA SULL' ATTIVITÀ ANTIBATTERICA DI POLY-ARG

L'aggiunta di Gelatina di tipo A al terreno di coltura ha causato un aumento dei valori di MBC su tutti i ceppi analizzati (Tabella 8) escluso per *B. cereus* dove l'attività antibatterica di poly-Arg sembrerebbe aumentare ma ulteriori analisi saranno necessarie per verificare tali risultati.

<u>Tabella 8</u>	MBC mg/ml					
	<i>B. subtilis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli O157H:7</i>	<i>P. aerugin</i>	<i>S. sonnei</i>	<i>S. thyph</i>
Poly-Arg	0,015	0,25	0,25	0,75	0,5	0,5
Poly-Arg + gelatina A	0,125	< 0,007	1	2	1	2

## PREPARAZIONE DEL FILTRATO DEGLI ISTONI H1 DEGUANIDINATI

La presenza di attività antibatterica nei saggi Kirby Bauer dell'istone H1 di C.T. deguanidinato, assente nell'istone nativo, ha suscitato interesse in quanto l'istone H1 di C.T. ha un ridotto contenuto in arginine, rispetto all'istone H1 di *Ch.v.* L'attività riscontrata, quindi potrebbe essere dovuta alla probabile formazione di un prodotto attivo derivato dalla frammentazione dell'istone piuttosto che alla conversione delle poche arginine in ornitine.

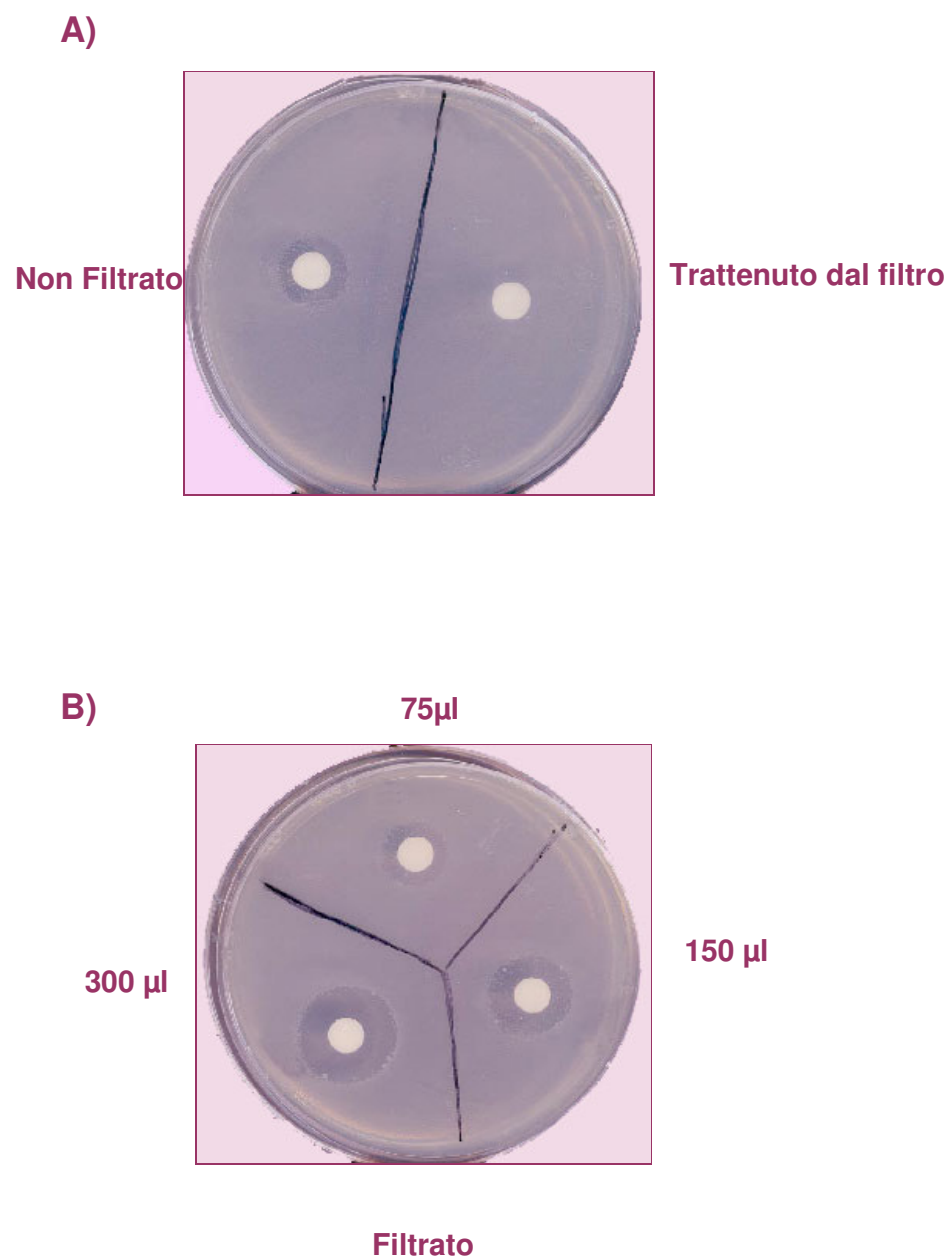
Poiché la deguanidinazione può causare la rottura della molecola, gli istoni H1 deguanidinati sono stati filtrati su filtri Millipore (cut off 3000 Da) e la frazione trattenuta dal filtro (TF) e quella filtrata (F) sono state saggiate su *B. subtilis* mediante saggi Kirby Bauer. Analisi condotte su entrambi gli istoni H1 di C.T. e di *Ch.v.* hanno indicato che l'attività antibatterica è assente nella frazione trattenuta dal filtro (Figura 14A) mentre si ritrova esclusivamente nel filtrato (Figura 14B). Le figure riportate si riferiscono all'istone H1 C.T. ma analogo risultato è stato ottenuto con l'istone H1 di *Ch.v.*. I saggi sono stati ripetuti anche in liquido su *B. cereus*; di nuovo la frazione trattenuta dal filtro non ha mostrato attività, che è presente invece nel filtrato con MBC di 0,013 mg/ml mentre il non filtrato ha mostrato un valore di MBC di 0,5 mg/ml. Le diverse frazioni sono state analizzate per elettroforesi su gel di poliacrilammide in SDS. In Figura 15 sono riportati i pattern elettroforetici dei filtrati derivati dagli istoni H1 di C.T. (A) e di *Ch.v.* (B). In entrambi i casi è possibile evidenziare nel filtrato la presenza di peptidi (pozzetto F) con un peso molecolare apparente di circa 13000 Da, anomalo se si considera il cut off dei filtri utilizzati; tali molecole potrebbero derivare dalla tendenza degli istoni, e quindi dei frammenti da essi derivati, di formare polimeri. Tali peptidi o altri a peso molecolare inferiore a 3000 Da potrebbero essere i responsabili dell'attività antibatterica. Dai patterns elettroforetici di entrambi gli istoni nativi si evidenzia la presenza di bande di degradazione con mobilità simile ai peptidi del filtrato. Quindi, per escludere che il peptide attivo fosse già presente nell'istone nativo, entrambi gli istoni sono stati sottoposti a filtrazione ma non si è riscontrata alcuna attività.

Per essere sicuri di poter escludere che l'attività antibatterica del filtrato fosse dovuta a sostanze chimiche sviluppatesi durante la reazione è stato saggiato un campione preparato con acqua sottoposta allo stesso trattamento di deguanidinazione dell'istone H1 sia nei saggi Kirby Bauer su *B. subtilis* che nei saggi di diluizioni scalari in liquido su *B. cereus* e non è stata registrata alcuna attività antibatterica.

Ulteriore conferma che l'attività antibatterica dell'istone deguanidinato fosse dovuta alle caratteristiche della proteina, è stata ottenuta saggiando mediante saggi Kirby Bauer una proteina deguanidinata con la stessa percentuale di arginine dell'istone H1 di C.T. e dimensioni simili, l'alcool deidrogenasi; non è stata riscontrata alcuna attività.

## CROMATOGRAFIA A FASE INVERSA PER HPLC (RP-HPLC) DEL FILTRATO DERIVATO DA H1 DI C.T. DEGUANIDINATO

Allo scopo di individuare eventuali peptidi responsabili dell'attività antibatterica prodotti durante la reazione di deguanidinazione, il filtrato derivato dall'istone H1 di C.T. deguanidinato è stato analizzato su RP-HPLC analitica e successiva RP-HPLC preparativa; si è analizzata l'attività delle frazioni corrispondenti ai picchi separati. Utilizzando 8 mg e 20 mg di istone deguanidinato, non si è riscontrata attività antibatterica probabilmente per la scarsa quantità ottenuta in seguito a purificazione



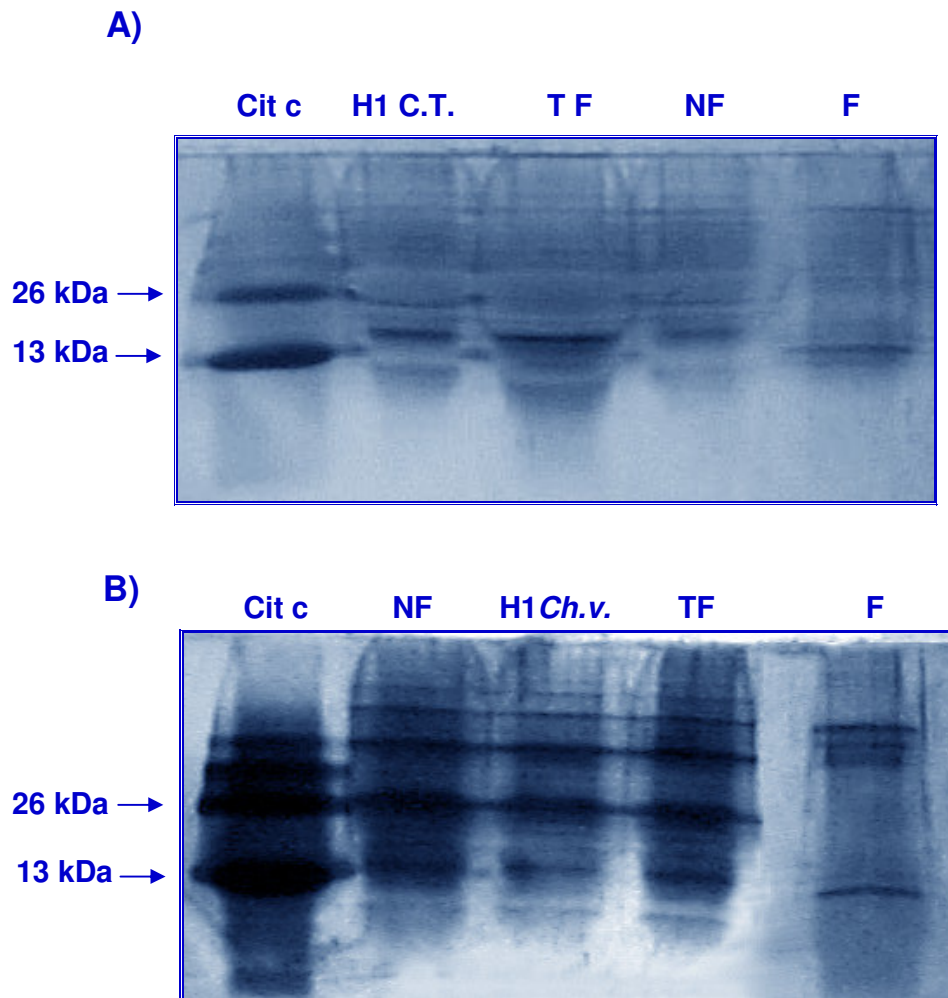
**Figura 14**

Saggio di attività antimicrobica (Kirby Bauer) su *B.subtilis* in presenza di:

**A)** 50 µg di istone H1 C.T. deguanidinato non filtrato e del trattenuto dal filtro

**B)** Filtrato derivato dall' istone H1 di C.T. deguanidinato in quantità crescenti.

su HPLC; si è quindi ripetuta la separazione su RP-HPLC utilizzando 40 mg di istone. Sono riportati nelle Figure 16 e 17 rispettivamente, i profili di eluizione dell'RP-HPLC analitica e preparativa, misurando l'assorbanza del filtrato alla lunghezza d'onda di 210 nm; si notano diversi picchi di varia intensità alcuni dei quali molto vicini l'uno all'altro. I picchi sono stati raccolti e raggruppati in cinque frazioni che sono state liofilizzate e saggate su *B.cereus*, mediante saggio di diluizioni scalari in liquido e in solido; l'attività è stata riscontrata solo nei due picchi con tempi di ritenzione più bassi.

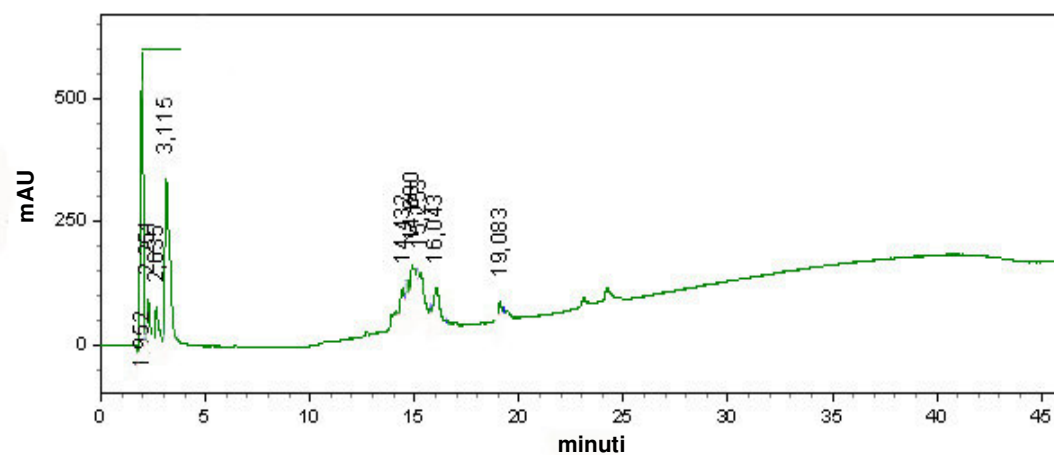


**Figura 15**

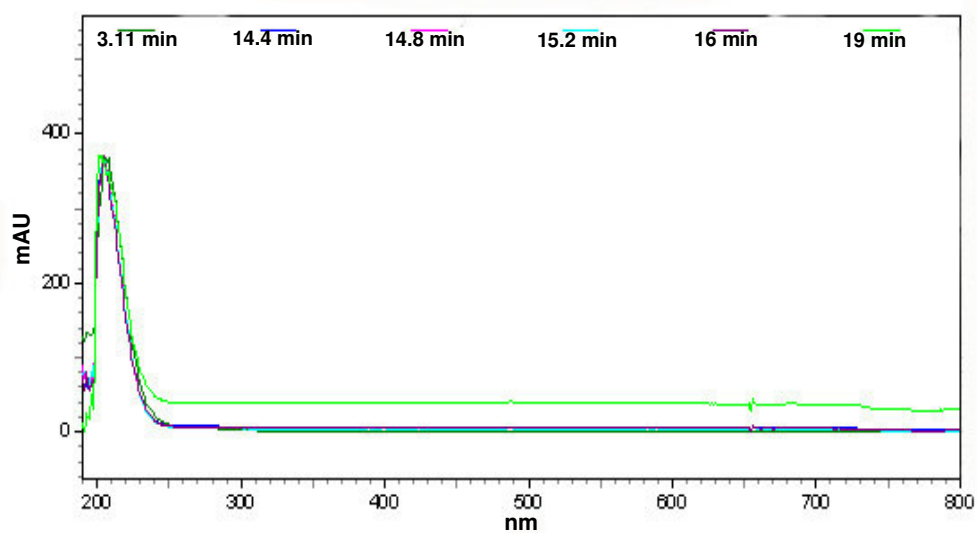
SDS-PAGE al 18% degli istoni H1 C.T. (A) e *Ch.v.* (B) deguanidinati e dei filtrati da essi derivati.

NF, TF, F ⇒ istone deguanidinato Non Filtrato, Trattenuto dal filtro, Filtrato  
Cit.c ⇒ Citocromo c

**A)**



**B)**

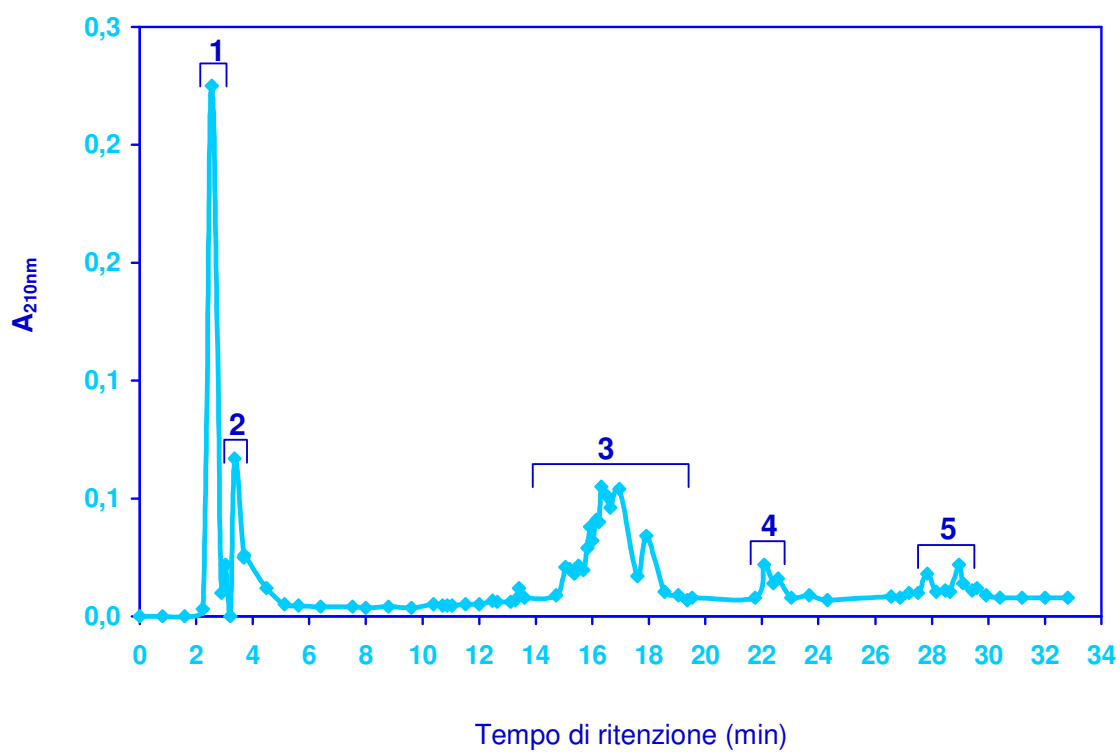


**Figura 16**

Analisi mediante RP-HPLC del filtrato derivato da 40 mg dell' istone H1 C.T. deguanidinato:

**A)** Profilo di eluizione a  $\lambda = 210$  nm

**B)** Spettro di assorbimento da 200 a 800 nm dei singoli picchi



**Figura 17**

RP-HPLC del filtrato derivato dall'istone H1 di C.T. deguanidinato:

Frazioni raccolte e saggiate:

- 1= da 2,2 a 2,88 min
- 2= da 3,04 a 4,48 min
- 3= da 13,1 a 18,56 min
- 4= da 21,7 a 23 min
- 5= da 27,5 a 29,6 min

## STUDIO DEL MECCANISMO MOLECOLARE DI AZIONE DELLE MOLECOLE AD ATTIVITÀ ANTIBATTERICA

### REAZIONE DI MARCATURA DI POLY-ARG CON DEAC,SE E PURIFICAZIONE MEDIANTE RP-HPLC

Ai fini di indagare sul meccanismo di azione delle molecole ad attività antibatterica si è scelta la poly-Arg come molecola modello, che è stata da noi resa fluorescente per poi studiarne la distribuzione nella cellula batterica.

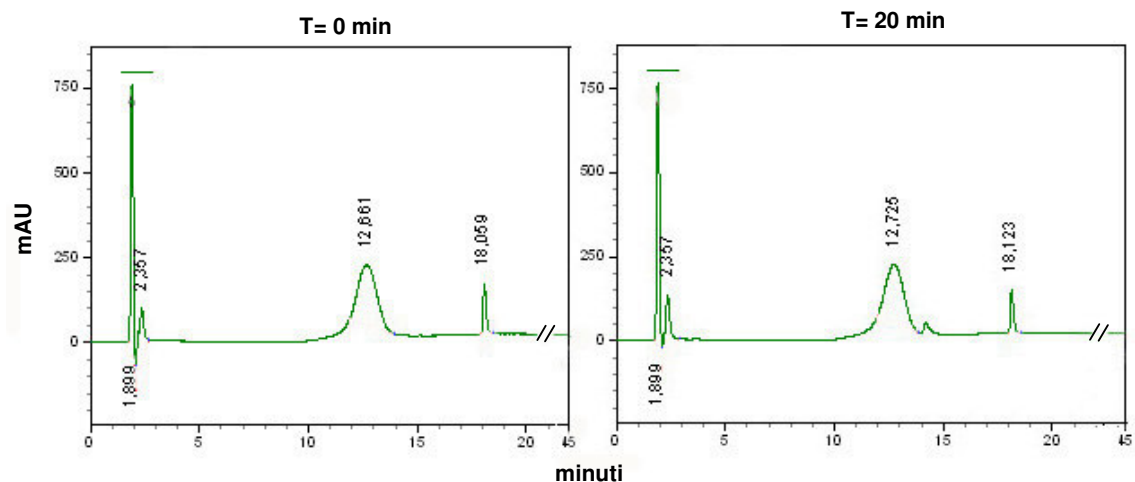
Si è dapprima messa a punto la reazione di marcatura di poly-Arg con DEAC,SE, che reagisce con i gruppi amminici liberi, e che è stata seguita mediante analisi su RP-HPLC analitica. Inizialmente poly-Arg e DEAC,SE sono stati utilizzati in un rapporto molare di 1:1 e sono stati fatti prelievi a vari tempi di incubazione. A tempo zero e dopo 20 minuti il profilo di eluizione (Figura 18A) è identico e dagli spettri di assorbimento alle lunghezze d'onda di poly-Arg (210 nm) e del fluoroforo (433 nm) è evidente che corrispondono alle molecole singole che non hanno ancora reagito (Figura 18B). Dopo due ore (Figura 19A) comincia a comparire un picco che ha le caratteristiche di assorbimento sia di poly-Arg che i due picchi del fluoroforo (Figura 19B), ma la maggior parte della poly-Arg e del fluoroforo non hanno ancora reagito poiché la reazione è risultata troppo lenta. Sono stati quindi aggiunti altri 2 equivalenti di fluoroforo e la reazione è stata lasciata proseguire overnight. Dal profilo di eluizione (Figura 19A) dei prodotti di reazione è evidente che la reazione di marcatura è andata a completezza in quanto sono scomparsi i picchi corrispondenti a poly-Arg e DEAC,SE ed è presente un picco unico il cui spettro di assorbimento mostra le caratteristiche di entrambe le molecole (Figura 19B). La purificazione del prodotto di reazione è stata effettuata su RP-HPLC preparativa ed il profilo di eluizione è riportato in Figura 20. Le frazioni con tempi di ritenzione compresi tra 14 e 16 minuti sono state analizzate su RP-HPLC analitico per verificarne la purezza. Le frazioni pure sono state unite e liofilizzate.

### MICROSCOPIA A FLUORESCENZA

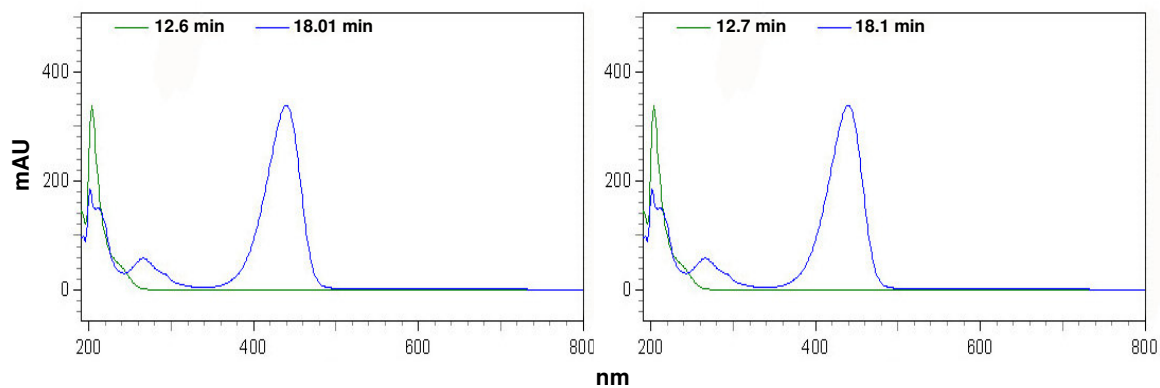
Al fine di indagare sulla localizzazione cellulare della molecola fluorescente batteri dei due ceppi *B. cereus* ed *E. coli* O157:H7 sono stati incubati in presenza di poly-Arg marcata con DEAC,SE ed il segnale è stato rivelato mediante microscopio a fluorescenza. La Figura 21 (A e C) mostra che parte della fluorescenza è sulla superficie della cellula batterica mentre parte di essa però è anche all'interno della cellula come si evince dal confronto con i risultati ottenuti utilizzando sugli stessi batteri il 4', 6-diamino-2-phenylindole (DAPI) (Figura 21 B e D). Come è noto il DAPI entra nelle cellule e lega il DNA. Gli esperimenti condotti con DEAC,SE non coniugato alla poly-Arg non hanno prodotto alcun segnale di interazione tra il fluoroforo e la cellula batterica indicando la necessità della presenza di poly-Arg per tale interazione. Le immagini a fluorescenza avendo quindi mostrato parte della fluorescenza all'interno delle cellule suggerisce che poly-Arg possa svolgere probabilmente la sua funzione su alcuni componenti intracellulari.



**A)**



**B)**



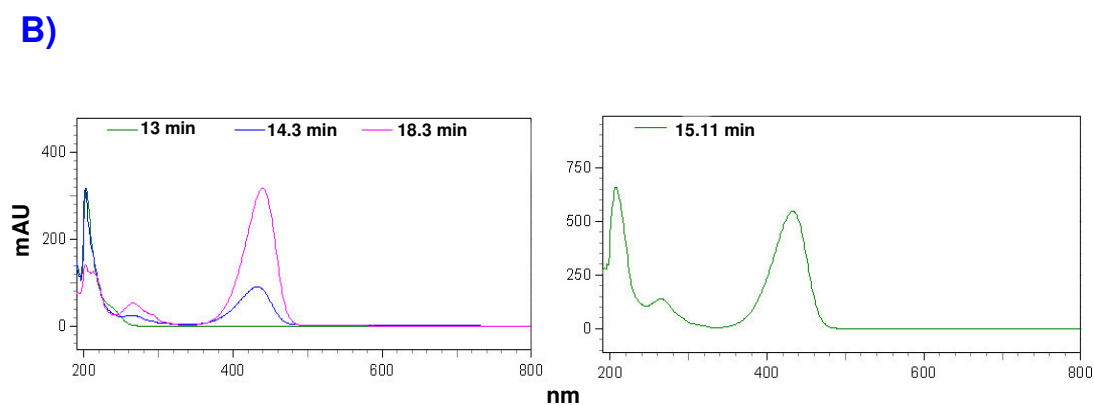
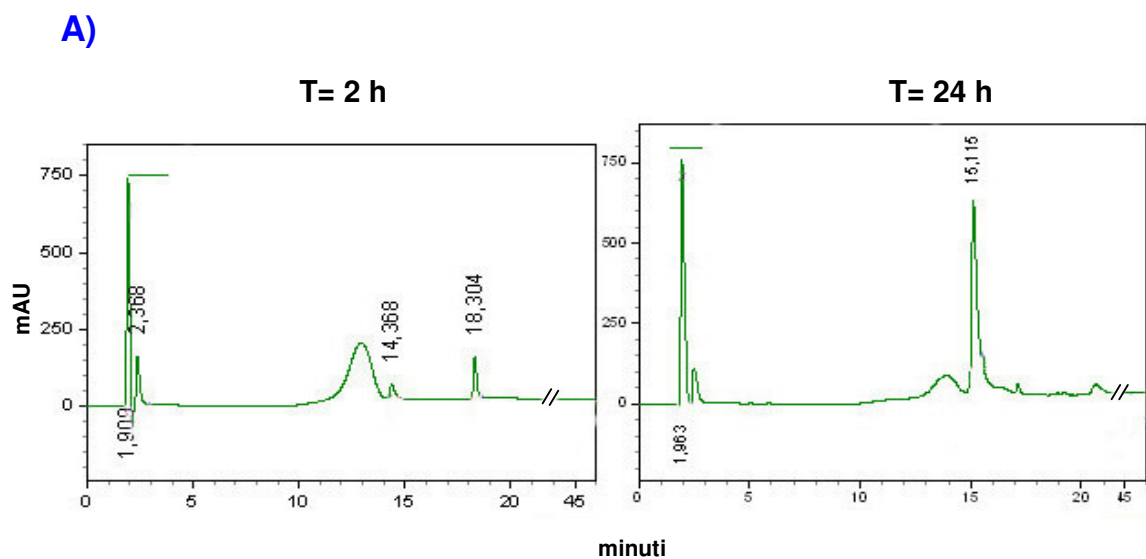
**Figura 18**

Analisi mediante RP-HPLC della reazione di marcatura di poly-Arg con DEAC,SE:

**A)** Profili di eluizione a  $\lambda = 210$  nm al tempo zero e dopo 20 minuti di incubazione

**B)** Spettri di assorbimento da 200 a 800 nm dei singoli picchi

corrispondenti a poly-Arg ( $T_{ritenz} = 12,6$  min) e DEAC,SE ( $T_{ritenz} = 18,01$  min)



**Figura 19**

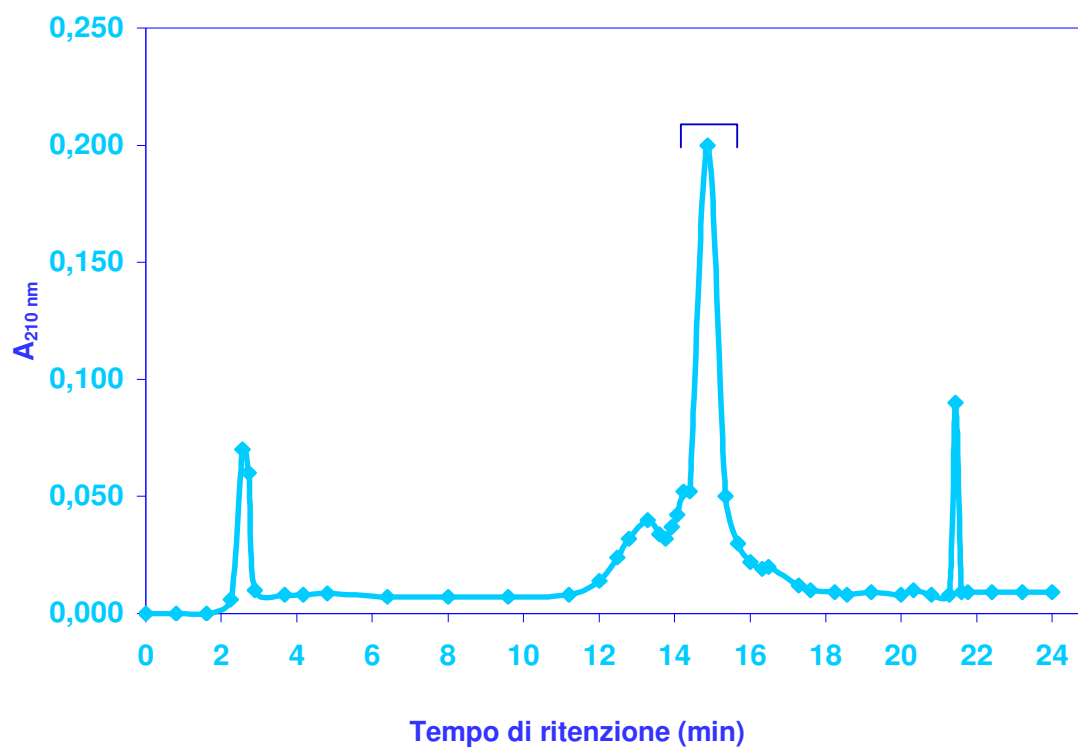
Analisi mediante RP-HPLC della reazione di marcatura di poly-Arg con DEAC,SE:

**A)** Profili di eluizione a  $\lambda = 210$  nm dopo 2h e 24 h di incubazione

**B)** Spettri di assorbimento da 200 a 800 nm dei picchi corrispondenti a poly-Arg

( $T_{ritenz} = 13$  min), poly-Arg-[DEAC,SE] ( $T_{ritenz} = 14,3$  min e 15,11 min) e DEAC,SE

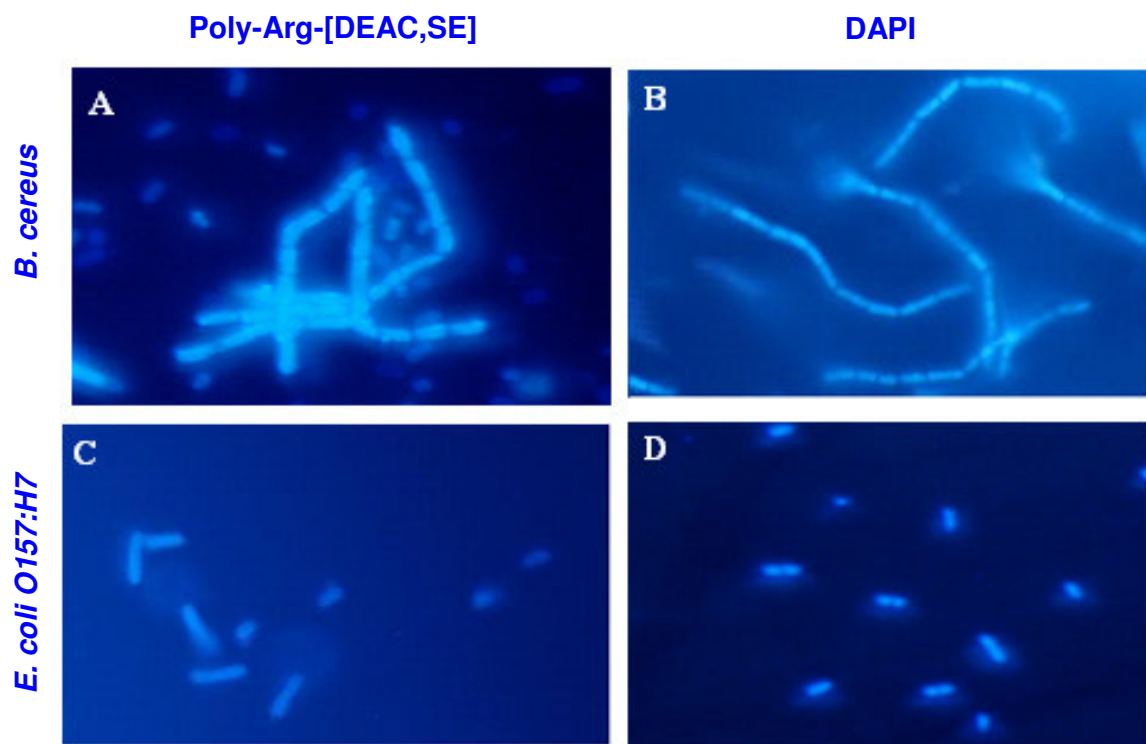
( $T_{ritenz} = 18,3$  min)



**Figura 20**

Separazione per RP-HPLC della poly-Arg marcata con DEAC,SE.

Frazioni raccolte : da 14 a 16 minuti



**Figura 21**

Immagini di microscopia a fluorescenza del risultato dell'interazione tra poly-Arg-[DEAC,SE] e *B.cereus* (**A**) e *E.coli* O157:H7 (**C**). Nei riquadri **B** e **D** è mostrata la colorazione con DAPI di *B.cereus* ed *E. coli* O157:H7, rispettivamente.

## SAGGI EMSA UTILIZZANDO DNA PLASMIDICO E GENOMICO

Sulla base dei risultati di microscopia a fluorescenza e delle proprietà chimiche e funzionali delle molecole utilizzate si può ipotizzare che le molecole che entrano all'interno della cellula batterica hanno come probabile target il DNA. Saggi EMSA precedenti avevano dimostrato che l'interazione tra l'istone H1 di spermatozoi e il DNA avviene con modalità tutto o nulla, in cui si osserva o DNA a migrazione non perturbata o praticamente nel pozzetto (Figura 4A); invece l'interazione del DNA con l'istone somatico dà luogo ad una varietà di patterns con bande a mobilità gradualmente minore all'aumentare del rapporto istone/DNA mentre la banda corrispondente al DNA nudo è praticamente assente (Figura 4B). Con il saggio EMSA si è quindi studiata l'interazione tra il DNA del plasmide pGEM3 linearizzato per digestione con l'enzima di restrizione Sma I e le molecole che hanno mostrato attività antibatterica (protamina di *Ch.v.*, salmina, salmina solfato, clupeina solfato, poly-Arg e poly-Lys, ed istoni H1 di C.T. e di *Ch.v.* modificati). Saggi EMSA sono stati eseguiti anche con DNA genomico estratto da *E.coli* frammentato per sonicazione, in presenza di poly-Arg o di istone H1 di C.T..

In Figura 22 è riportato il confronto dei pattern elettroforetici delle forme risultanti dall'interazione tra l'istone di *Ch.v.* e la protamina di *Ch.v.* col DNA. Come si può notare la modalità di legame al DNA della protamina è simile a quella dell'istone H1 di *Ch.v.*. Ovvero non si formano bande intermedie a mobilità ritardata come nel caso dell'istone H1 somatico, ma si riscontra nuovamente una modalità di interazione tutto o nulla. In Figura 23 è mostrato il confronto dei pattern elettroforetici delle forme risultanti dall'interazione tra protamina di *Ch.v.* e salmina con il DNA; è da notare che entrambe le molecole hanno una modalità di interazione del tipo "tutto o nulla", con stessa efficienza di legame al DNA, poiché la banda di DNA plasmidico a mobilità massima scompare con entrambe le proteine a partire dal rapporto percentuale (w/w) protamina/DNA di 60. Lo stesso esperimento condotto con salmina solfato (Figura 24) ha rivelato una minor efficienza di legame al DNA della salmina solfato rispetto alla salmina in quanto la banda a mobilità massima scompare a partire dal rapporto percentuale 60 per la salmina e 200 per la salmina solfato. La diminuzione di efficienza è probabilmente causata dalla diminuzione di carica netta dovuta alla presenza dell'anione solfato.

In Figura 25 è riportato il risultato del confronto tra i pattern elettroforetici delle forme risultanti dall'interazione tra la protamina di *Ch.v.* e la clupeina solfato col DNA. La modalità di legame al DNA delle due proteine è la stessa, ma la protamina di *Ch.v.* mostra un'efficienza di legame al DNA maggiore rispetto alla clupeina solfato, la cui interazione con il DNA determina la completa scomparsa della banda a migrazione massima solo ad un rapporto percentuale (w/w) clupeina/DNA pari a 200.

Allo scopo di verificare se la deguanidiazione delle molecole ad attività antibatterica avesse effetto anche sull'interazione col DNA sono stati effettuati saggi EMSA anche sulle molecole modificate.

In Figura 26 è riportato il confronto tra i pattern elettroforetici delle forme risultanti dall'interazione tra l'istone H1 di *Ch.v.* nativo e deguanidinato col DNA. Il derivato deguanidinato mostra, a differenza della molecola nativa, una modalità di legame al DNA di tipo graduale.

Nella Figura 27 è riportato il confronto tra i pattern elettroforetici delle forme risultanti dall'interazione tra l'istone H1 di C.T. nativo e deguanidinato col DNA. Si può osservare che la deguanidiazione dell'istone H1 somatico non altera la sua modalità di interazione con il DNA, in quanto sia la forma nativa che quella modificata

determinano la comparsa di bande gradualmente ritardate a partire da un rapporto percentuale (w/w) istone/DNA pari a 10. Inoltre, l'istone nativo e quello deguanidinato hanno efficienze di legame al DNA simili, in quanto con entrambe le molecole la comparsa della banda di DNA plasmidico a mobilità nulla avviene al rapporto percentuale istone/DNA di 60.

Questo potrebbe essere in accordo con l'ipotesi che nel caso dell'istone H1 di C.T. non è tanto la modifica chimica responsabile dell'attività antibatterica quanto la presenza di un prodotto di frammentazione della proteina.

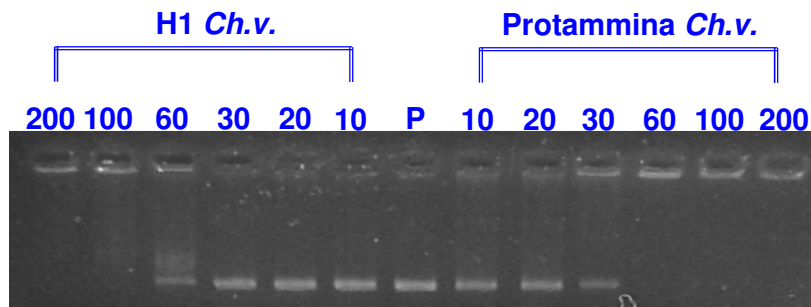
In Figura 28 è mostrato il confronto dei pattern elettroforetici delle forme risultanti dall'interazione tra protamina nativa e deguanidinata col DNA. In seguito alla deguanidinazione la modalità di legame al DNA della protamina di *Ch.v.* risulta essere non più del tipo "tutto o nulla" ma si evidenziano bande a mobilità intermedia molto simili a quelle osservate per l'istone H1 somatico. Inoltre è evidente una diminuzione di efficienza di legame al DNA della protamina deguanidinata in quanto la banda a mobilità nulla si osserva solo ad un rapporto 200.

La Figura 29 mostra il confronto dei pattern elettroforetici delle forme risultanti dall'interazione tra clupeina nativa e deguanidinata col DNA. I due pattern sono molto simili, con l'unica differenza che al rapporto clupeina deguanidinata/DNA 200 il DNA è presente ancora in parte nella forma a mobilità massima, indicando che la parziale deguanidinazione della clupeina (Tabella 4) determina una lieve diminuzione della sua efficienza di legame al DNA.

Nella Figura 30 è mostrato il confronto tra i pattern elettroforetici delle forme risultanti dall'interazione tra protamina di *Ch.v.* nativa, succinilata e acetilata col DNA. Tutte le modifiche determinano una perdita di efficienza di legame della protamina al DNA, poiché la banda di DNA plasmidico a mobilità nulla compare ad un rapporto percentuale (w/w) protamina/DNA pari a 60 per la protamina nativa, a 100 nel caso della protamina acetilata, mentre per la protamina succinilata il DNA plasmidico non risulta saturato neanche a rapporti percentuali (w/w) protamina/DNA pari a 200. Anche in quest'ultimo caso si osserva il cambiamento della modalità di legame da quella "tutto o nulla" a quella "graduale".

La Figura 31 mostra il saggio EMSA in presenza di poly-Arg e poly-Lys in cui è possibile evidenziare una modalità di legame al DNA di tipo "tutto o nulla", simile all'istone H1 di spermatozoo, per poly-Arg mentre poly-Lys presenta una modalità di legame al DNA simile a quello dell'istone H1 somatico.

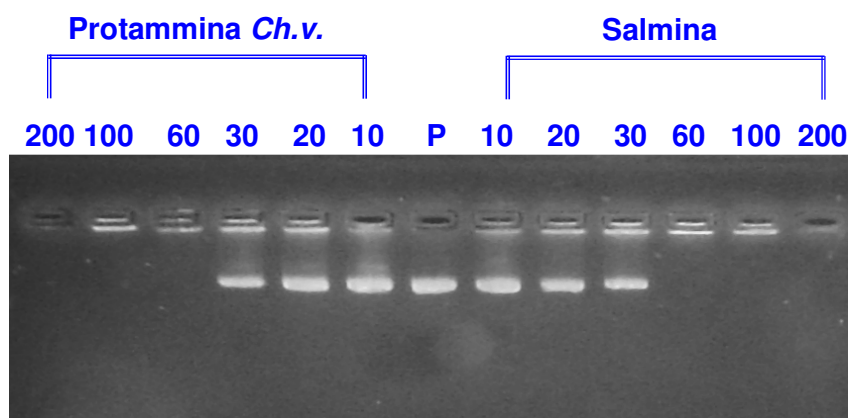
In Figura 32 è mostrato il confronto tra la modalità di legame al DNA genomico di *E. coli* della poly-Arg e quella dell'istone H1 di C.T.. La poly-Arg sembra essere più efficiente nel legame al DNA rispetto all'istone H1 in quanto satura il DNA ad un rapporto percentuale (w/w) poly-Arg/DNA di 200 mentre l'istone ad un rapporto 400 mostra ancora DNA non saturato. Inoltre la modalità di legame della poly-Arg è del tipo "tutto o nulla" mentre quella dell'istone è di tipo graduale e questo rispecchia il comportamento che entrambe le molecole hanno mostrato nell'interazione con il DNA plasmidico.



**Figura 22**

EMSA su gel di agarosio 1,8% dei campioni di DNA plasmidico pGEM3 in presenza di quantità crescenti di istone H1 di *Ch.v.* e di protamina di *Ch.v.* nei rapporti percentuali (w/w) proteina/DNA: 10, 20, 30, 60, 100, 200.

P: pGEM3 in assenza di proteina.

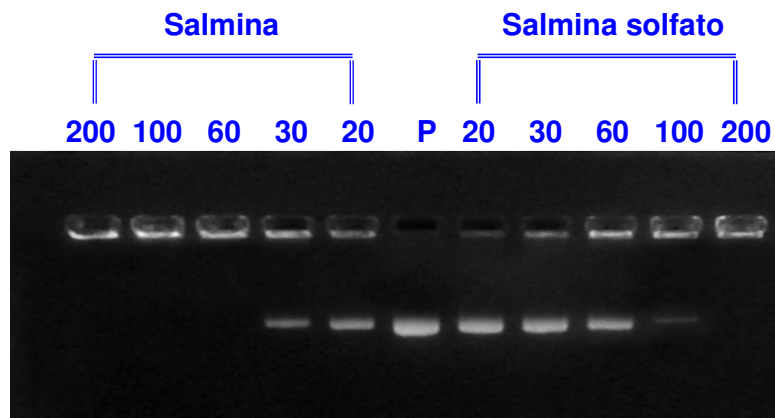


**Figura 23**

EMSA su gel di agarosio 1,8% dei campioni di DNA plasmidico pGEM3 in presenza di quantità crescenti di protamina di *Ch.v.* e di salmina nei rapporti percentuali (w/w) proteina/DNA: 10, 20, 30, 60, 100, 200.

P: pGEM3 in assenza di proteina.

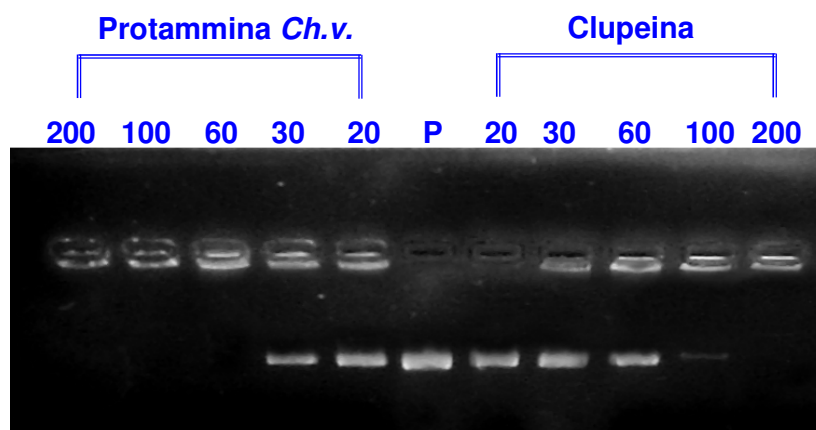




**Figura 24**

EMSA su gel di agarosio 1,8% dei campioni di DNA plasmidico pGEM3 in presenza di quantità crescenti di salmina e di salmina solfato nei rapporti percentuali (w/w) salmina/DNA: 20, 30, 60, 100, 200.

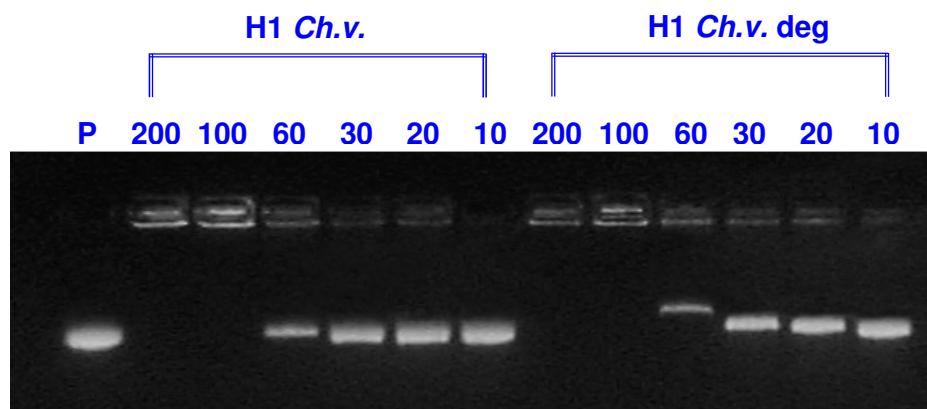
P: pGEM3 in assenza di proteina.



**Figura 25**

EMSA su gel di agarosio 1,8% dei campioni di DNA plasmidico pGEM3 in presenza di quantità crescenti di protamina di *Ch.v.* e clupeina nei rapporti percentuali (w/w) protamina/DNA: 20, 30, 60, 100, 200.

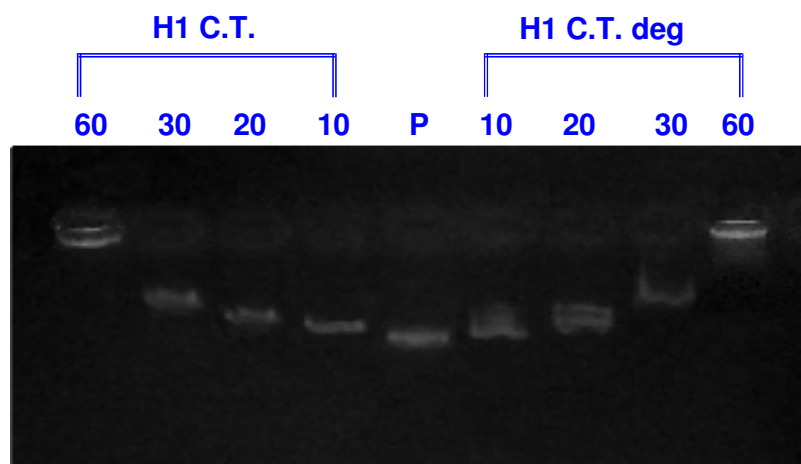
P: pGEM3 in assenza di proteina.



**Figura 26**

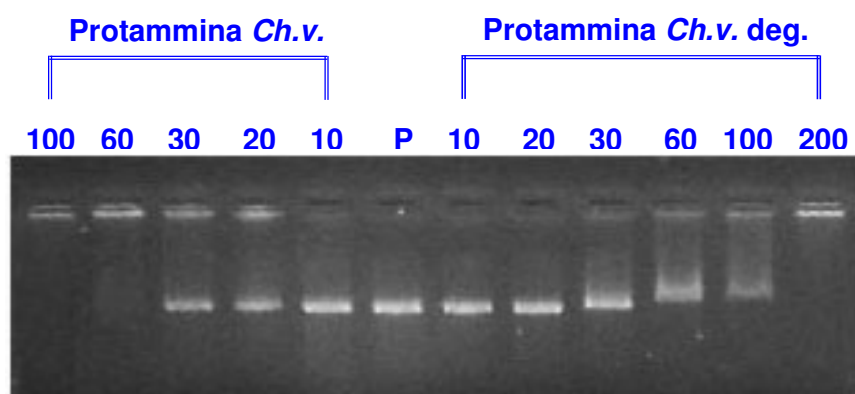
EMSA su gel di agarosio 1,8% dei campioni di DNA plasmidico pGEM3 in presenza di quantità crescenti di istone H1 di *Ch.v.* nativo e deguanidinato nei rapporti percentuali (w/w) H1/DNA: 10, 20, 30, 60, 100, 200.

P: pGEM3 in assenza di proteina.



**Figura 27**

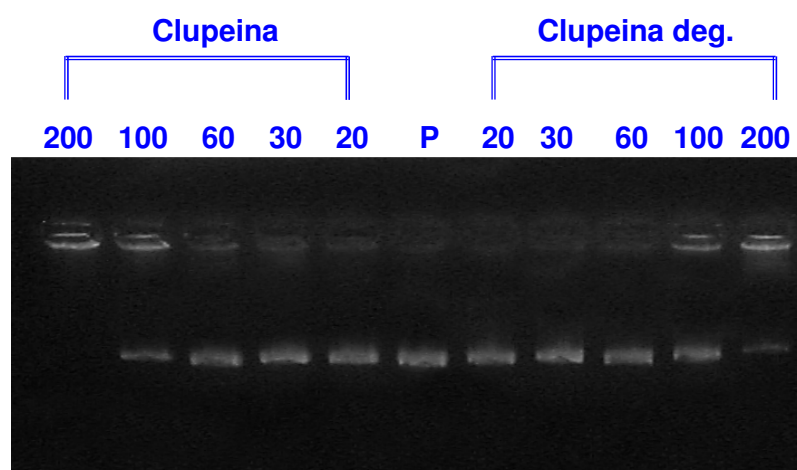
EMSA su gel di agarosio 1,8% dei campioni di DNA plasmidico pGEM3 in presenza di quantità crescenti di istone H1 di C.T. nativo e deguanidinato nei rapporti percentuali (w/w) H1/DNA: 10, 20, 30, 60. P: pGEM3 in assenza di proteina.



**Figura 28**

EMSA su gel di agarosio 1,8% dei campioni di DNA plasmidico pGEM3 in presenza di quantità crescenti di protamina di *Ch.v.* nativa e deguanidinata nei rapporti percentuali (w/w) protamina/DNA: 10, 20, 30, 60, 100, 200.

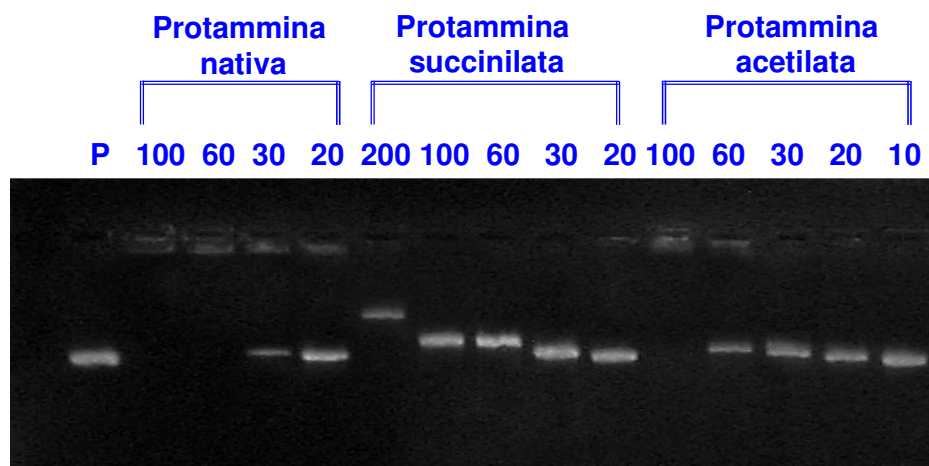
P: pGEM3 in assenza di proteina.



**Figura 29**

EMSA su gel di agarosio 1,8% dei campioni di DNA plasmidico pGEM3 in presenza di quantità crescenti di clupeina nativa e deguanidinata nei rapporti percentuali (w/w) protammina/DNA: 20, 30, 60, 100, 200.

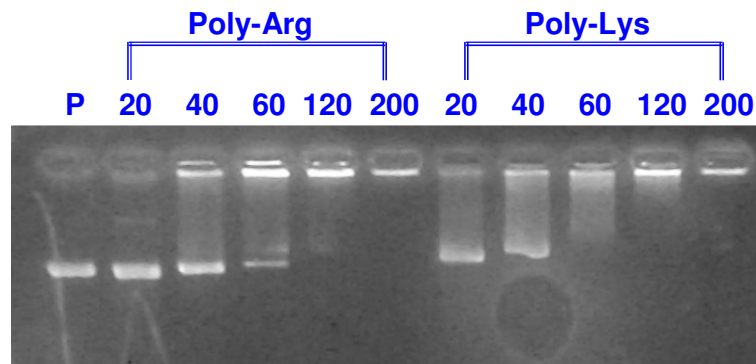
P: pGEM3 in assenza di proteina.



**Figura 30**

EMSA su gel di agarosio 1,8% dei campioni di DNA plasmidico pGEM3 in presenza di quantità crescenti di protamina di *Ch.v.* nativa, succinilata e acetilata nei rapporti percentuali (w/w) protamina/DNA: 10, 20, 30, 60, 100, 200.

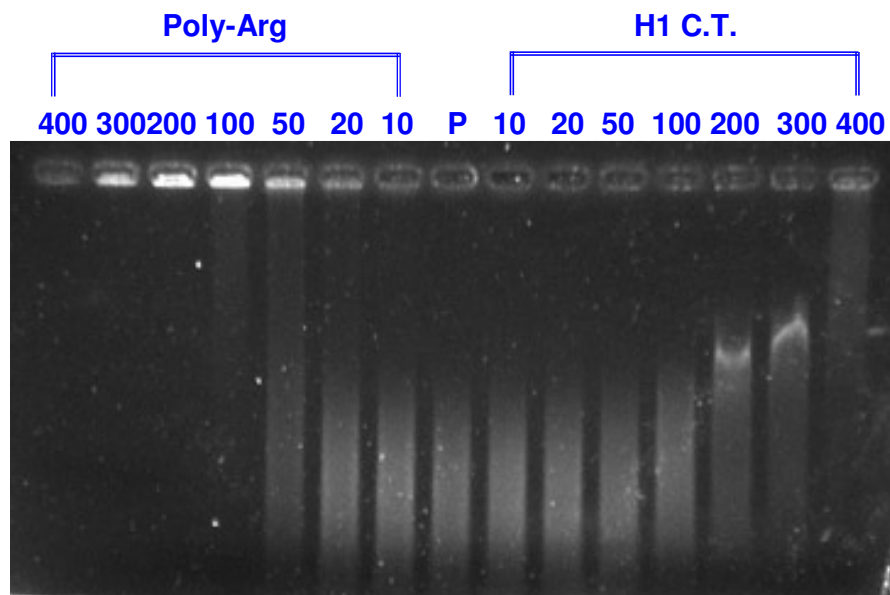
P: pGEM3 in assenza di proteina.



**Figura 31**

EMSA sul gel di agarosio 1,8% dei campioni di DNA plasmidico pGEM3 in presenza di quantità crescenti di poly-Arginina e di poly-Lisina nei rapporti percentuali (w/w) polimeri/DNA: 20, 40, 60, 120, 200. P: pGEM3 in assenza di polimeri.





**Figura 32**

EMSA su gel di agarosio 1% dei campioni di DNA genomico di *E.coli* in presenza di quantità crescenti di poly-Arg e istone H1 C.T. nei rapporti percentuali proteina/DNA: 10, 20, 50, 100, 200, 300, 400.  
P: DNA genomico in assenza di proteina.

## DISCUSSIONI E CONCLUSIONI

Una recente tendenza nei processi di conservazione degli alimenti è di abbandonare l'uso di conservanti chimici e di ricercare nuove alternative antimicrobiche naturali. La produzione di molecole antimicrobiche, proteine o peptidi, è stata riscontrata in molti organismi viventi come componente del loro sistema immunitario (54) e potrebbe rappresentare una fonte di potenziali "bioconservanti". La possibilità di isolare molecole antimicrobiche e di caratterizzarle per struttura, composizione e meccanismo d'azione rappresenta un traguardo importante soprattutto per l'industria alimentare, ormai da tempo al centro di numerose polemiche per l'utilizzo frequente di conservanti chimici, alcuni dei quali ritenuti dannosi per l'uomo. Il punto di partenza di tale progetto è stato verificare dati preliminari presenti in letteratura riguardo l'attività antimicrobica di alcune protammine estendendo l'analisi anche ad altri ceppi batterici. E' stata analizzata l'attività antibatterica di molecole policationiche di origine naturale e di sintesi sui principali agenti patogeni che contaminano i cibi. Tra le molecole naturali sono state quindi saggiate protammine di aringa e salmone, istoni di origini diverse (da spermi di *Chaetopterus variopedatus* e da Timo di vitello) mentre tra le molecole di sintesi sono stati scelti i polimeri di lisina (poly-Lys) e di arginina (poly-Arg). La scelta di tali molecole è in parte dovuta alle informazioni riportate in letteratura da cui si evince che la maggior parte delle molecole ad attività antimicrobica sia caratterizzata principalmente da amminoacidi basici, da un peso molecolare ridotto e da una struttura secondaria tendenzialmente ad  $\alpha$  elica. In prima istanza sono stati effettuati saggi Kirby Bauer con le molecole in esame sui vari ceppi batterici da cui è risultata una minima attività antibatterica essendo le sostanze attive a concentrazioni comprese tra 1 mg/ml e 5 mg/ml e in alcuni casi, come l'istone H1 di C.T. l'attività è risultata del tutto assente. L'influenza dei residui con carica positiva sull'attività antibatterica è stata valutata mediante modifiche chimiche a carico dei residui di lisina e di arginina di alcune delle molecole in esame. Le proteine modificate per deguanidinazione delle arginine (entrambi gli istoni H1, la protammina di *Ch.v.* e di aringa) hanno mostrato attività antibatterica maggiore delle molecole native; mentre i derivati modificati nelle lisine per acetilazione e succinilazione della protammina di *Ch.v.* hanno mostrato un'attività antibatterica paragonabile alla molecola nativa. Questi risultati potrebbero indicare che la deguanidinazione, che non comporta cambiamenti nella carica netta positiva, abbia un effetto sulla molecola tale da migliorarne l'attività, probabilmente generando peptidi attivi che sono più efficaci della molecola nativa. E' infatti riportato in letteratura che la reazione di deguanidinazione con idrazina comporta rottura del legame peptidico in funzione del tempo di esposizione all'idrazina, alla sua concentrazione e alla temperatura (55). Il fatto che i derivati della protammina modificati nelle lisine per acetilazione e succinilazione mantengano l'attività antibatterica si potrebbe invece attribuire all'elevato contenuto di arginine presenti nella protammina di *Ch.v.* (47%) o al fatto che un numero molto ridotto di residui di lisina non viene perso in seguito a modificazione per cui l'attività persiste. Una situazione simile è stata di recente riportata anche per la nisina Z in cui solo tre residui di lisina sembrano essere critici per l'interazione con la membrana batterica e la successiva penetrazione all'interno della cellula da parte della nisina (34). Sarebbe infatti molto interessante riuscire ad individuare quale regione delle suddette proteine è responsabile dell'attività antibatterica. Inoltre nel caso della succinilazione, che aggiunge gruppi carichi negativamente alla molecola, non sorprende il persistere dell'attività antibatterica in quanto vi sono alcuni esempi di peptidi anionici ad attività antibatterica (24).

L'attività delle molecole in esame è stata valutata anche mediante saggi di diluizioni scalari in liquido e solido che consentono di determinare i valori di Minima Concentrazione Inibente (MIC) e Minima Concentrazione Battericida (MBC) necessari per poter, in futuro, valutare la quantità da utilizzare negli alimenti. Tali saggi hanno confermato i risultati presenti in letteratura riguardo alcune protammine (32) ed hanno evidenziato che tutte le molecole analizzate hanno attività antibatterica; ciascun ceppo inoltre ha mostrato sensibilità diversa a seconda del tipo di molecola con valori di MIC e MBC tendenzialmente più alti sui Gram<sup>-</sup> che sui Gram<sup>+</sup>. Per alcune molecole i valori di MIC e di MBC sono simili e abbastanza bassi indicando maggiore sensibilità di quel ceppo nei confronti della molecola. E' il caso di poly-Lys e poly-Arg su *B. subtilis*, *L. monocytogenes* e *S. aureus*, e della salmina su *S. sonnei*. Altre molecole hanno mostrato una corrispondenza tra i valori di MIC ed MBC come la salmina e la salmina solfato sui batteri Gram<sup>+</sup> ma con valori più alti rispetto a poly-Lys e poly-Arg. E' da notare che la salmina solfato è risultata meno efficiente della salmina presumibilmente perchè i gruppi solfato potrebbero neutralizzare alcune cariche positive riducendo l'attività antibatterica. La clupeina solfato pur essendo simile alla salmina solfato è risultata più efficiente sulla maggior parte dei Gram<sup>+</sup> mentre sui batteri Gram<sup>-</sup> la loro efficienza è variabile. In definitiva, i valori di MBC indicano che il peso molecolare potrebbe non essere un parametro critico per l'attività poiché le molecole saggiate, variando da 4000 Da della salmina e clupeina a 14000 Da di poly-Lys e poly-Arg, hanno mostrato attività antibatterica paragonabile.

I risultati ottenuti confermano dati preliminari presenti in letteratura in cui è riportata l'attività antimicrobica di alcuni istoni (42) su batteri Gram<sup>+</sup>, Gram<sup>-</sup>, lieviti e funghi. Il diverso comportamento di alcune molecole nei diversi approcci sperimentali potrebbe essere dovuto nel caso del saggio Kirby Bauer, alla maggiore o minore capacità di diffondere delle molecole nel terreno agarizzato che potrebbe essere critica per la loro attività.

Per una visione globale dell'efficienza di tali molecole, la loro attività è stata misurata al variare di alcuni parametri quali pH, salinità, temperatura, composizione chimica del terreno di coltura cercando di rispecchiare quelle riscontrabili negli alimenti. Il pH degli alimenti può variare da 4 a 8.5 ed è per tale motivo che i valori di MBC di salmina e salmina solfato sono stati misurati in tale intervallo di pH del terreno di coltura. Entrambe le molecole hanno mostrato un optimum di attività a valori di pH compresi tra 7 e 8. Tale comportamento potrebbe essere spiegato considerando che la maggior parte delle molecole basiche ha la tendenza ad essere assorbita dalle componenti del terreno e della cellula batterica e che tale assorbimento aumenta all'aumentare del pH (56). E' stato infatti riscontrato un aumento del legame della protammina alle superfici cellulari di *L. monocytogenes* e *E. coli* in un intervallo di pH da 5 a 8 che si manifesta con una riduzione dei valori di MIC in tale intervallo. Ne consegue che l'aumento dell'attività della salmina e salmina solfato a pH alcalini potrebbe essere quindi dovuta ad un aumento nell'affinità elettrostatica per la superficie della cellula bersaglio. L'ipotesi che l'attrazione elettrostatica rappresenti il primo stadio dell'interazione tra queste molecole policationiche e la membrana della cellula bersaglio è stata fornita anche da alcune analisi preliminari condotte in questo lavoro di tesi allo scopo di mimare il comportamento delle molecole antibatteriche negli alimenti. E' stato infatti valutato il valore di MBC di poly-Arg su gran parte dei ceppi batterici dopo l'aggiunta nel terreno liquido di una gelatina di tipo A (pI =7-9) per verificare se la presenza di altre proteine con carica positiva potesse influenzare l'attività antibatterica di poly-Arg. I valori di MBC ottenuti sono stati quasi sempre

maggiori o al massimo uguali a quelli ottenuti in assenza di gelatina; solo su *B. cereus* l'attività di poly-Arg sembra essere maggiore in presenza di gelatina. Se si considera che a pH neutro la gelatina è principalmente carica positivamente la ridotta attività di poly-Arg probabilmente è attribuibile ad una sorta di competizione delle proteine cariche positivamente sui residui carichi negativamente della cellula batterica, che riduce la possibilità di interazione di poly-Arg. Da studi recenti condotti da Potter et al (57) sembrerebbe che non solo l'attrazione elettrostatica controlla il legame della protamina alla superficie cellulare in modo inversamente proporzionale al suo grado di modifica per deguanidinazione con 1,2-cicloexanedione negli intervalli di pH ai quali la superficie cellulare mantiene una carica netta negativa. Infatti tali autori hanno evidenziato un aumento del legame della protamina modificata nel 20% delle sue arginine alla superficie cellulare di *L. monocytogenes* a pH 7 rispetto alla protamina nativa e tale molecola modificata ha mostrato anche un valore di MIC inferiore. Ulteriori studi saranno quindi necessari per chiarire il ruolo delle interazioni elettrostatiche ai fini dell'attività antibatterica. E' stata inoltre valutata l'attività antibatterica della stessa poly-Arg e di poly-Lys su *B. cereus* e su *E.coli O157:H7* in presenza di NaCl 100 mM e Tris-HCl 10 mM pH 7.5. I valori di MBC ottenuti su *E.coli O157:H7* sono risultati per entrambe le molecole più alti di quelli ottenuti in assenza di sale mentre su *B. cereus* più bassi. Tale comportamento potrebbe indicare che i meccanismi d'azione delle due molecole su ceppi Gram<sup>+</sup> e Gram<sup>-</sup> potrebbero essere diversi e che probabilmente la membrana esterna di *E.coli O157:H7* risulta maggiormente stabilizzata dalla presenza del sale. D'altra parte è stato dimostrato che l'aggiunta di EDTA (agente chelante gli ioni bivalenti) al terreno di coltura aumenta la sensibilità dei Gram<sup>-</sup> all'azione antimicrobica di alcune protammine suggerendo la destabilizzazione del lipopolisaccaride di membrana in assenza di ioni bivalenti (32). Ulteriore conferma del diverso meccanismo molecolare sui due ceppi è stata ottenuta saggiando la miscela dei due polimeri di sintesi (rapporto 1:1) nelle stesse condizioni saline su entrambi i ceppi. I valori di MBC sono risultati su *B.cereus* più bassi o al massimo uguali ai rispettivi valori delle singole molecole sia in acqua che nelle stesse condizioni saline indicando una probabile sinergia dei due polimeri. Tale sinergia potrebbe derivare dalla formazione di aggregati di poly-Lys e poly-Arg dimostrata da studi precedenti effettuati nel laboratorio in cui è stato svolto questo progetto di ricerca (58). I risultati ottenuti su *E.coli O157H:7* sono stati completamente diversi in quanto i valori di MBC delle singole molecole in acqua sono sempre minori di quelli delle molecole singole in NaCl 100 mM Tris-HCl 10 mM e delle miscele. Tale differenza potrebbe essere dovuta sia alla maggiore stabilità dovuta ai sali, già discussa, sia alla maggiore selettività della membrana esterna dei Gram<sup>-</sup> che non consentirebbe l'eventuale ingresso dell'aggregato. Studi recenti hanno dimostrato che il lipopolisaccaride di membrana è il primo strato protettivo che attualmente controlla il legame e l'inserimento dei peptidi nei batteri Gram<sup>-</sup> (59). La diversa azione riscontrata tra le molecole antibatteriche analizzate in questo studio sui diversi ceppi batterici non sorprende in quanto studi condotti su peptidi antimicrobici hanno dimostrato che su batteri con caratteristiche di membrana diverse ma appartenenti allo stesso ceppo possono esservi differenze nell'efficienza e nella modalità di azione delle molecole antibatteriche (60). Tale differenza potrebbe essere molto evidente quando si confronta il comportamento delle molecole antibatteriche sui Gram<sup>+</sup> e Gram<sup>-</sup>. D'altra parte ancora non è chiaro perché alcuni peptidi siano attivi su un determinato ceppo batterico ma non su altri. Vi sono alcuni esempi in cui due peptidi prodotti nello stesso tessuto ed aventi caratteristiche chimiche molto simili hanno due

meccanismi d'azione completamente diversi. E' questo il caso delle Cecropine P1 e PR-39, estratte dall'intestino di maiale che esplicano la loro attività antibatterica su *E.coli* con un meccanismo diverso: la prima mediante lisi della cellula batterica, mentre la seconda con azione proteolitica che arresta la sintesi proteica e del DNA in tempi molto brevi (61).

Tra le tecniche di conservazione degli alimenti vi è, come già descritto, il trattamento alle alte temperature volto soprattutto ad eliminare le spore di alcuni microrganismi patogeni e a garantire una conservazione dell'alimento duratura nel tempo. Risulta quindi importante che un agente antimicrobico conservi la sua attività a tali temperature e la poly- Arg si è rivelata esserlo in quanto la sua attività antimicrobica su tutti i ceppi analizzati persiste anche dopo trattamento a 120°C in autoclave per 20 minuti, sebbene con valori di MBC superiori a quelli misurati per la molecola non riscaldata. Solo su *B. cereus* l'effetto della temperatura ha incrementato l'attività antimicrobica. Questa stabilità termica ha suggerito che la carica ma non la struttura delle molecole potrebbe essere importante per l'attività antimicrobica, supportando il suo eventuale utilizzo come conservante nei cibi.

Tutte le molecole finora analizzate derivano da particolari tessuti o sono state acquistate come prodotti di sintesi, ma sarebbe molto interessante poter individuare una molecola attiva che sia biosintetizzabile e quindi di interesse industriale. In genere tali molecole sono peptidi principalmente cationici di dimensioni non troppo grandi, come nel caso della già citata  $\epsilon$ -poly-lisina. In questo lavoro di tesi sono state ottenute evidenze sperimentali che potrebbero, con ulteriori analisi, portare in futuro alla realizzazione di un simile progetto. Infatti è stato osservato che le molecole deguanidinate degli istoni H1 di C.T. e *Ch.v.* mostrano un'efficace attività antibatterica in una frazione con peso molecolare minore di 3000 Da con un valore di MBC di 0,013 mg/ml, di gran lunga inferiore rispetto alla molecola nativa. Le dimensioni di tali molecole lasciano supporre che possa trattarsi di peptidi che potrebbero essersi generati dalla frammentazione delle proteine deguanidinate come si evince dai patterns elettroforetici (Figura 15 A e B). Ulteriore conferma che possa trattarsi di peptidi è stata ottenuta dai profili cromatografici a lunghezza d'onda di 210 nm ottenuti dall'analisi su RP-HPLC della frazione filtrata, che hanno mostrato la presenza di cinque picchi di cui i primi due con tempi di ritenzione più bassi sono attivi su *B. cereus*. Successive purificazioni cromatografiche consentiranno di isolare, identificare e caratterizzare le molecole attive.

La possibilità di individuare peptidi attivi derivati dall'istone H1 confermerebbe dati recenti presenti in letteratura in cui sono riportati esempi di peptidi antimicrobici derivati da istoni di origini diverse come l'oncoricina II dalle secrezioni della pelle della trota (62) e l'ipposina dal muco della pelle dell'alibut Atlantico (63), derivati dagli istoni H1 e H2A, rispettivamente. Per l'oncoricina II sembrerebbe che il meccanismo d'azione sia diverso dall'H1 estratto da fegato di salmone, in quanto da esperimenti di legame al doppio strato lipidico è risultato che il peptide è in grado di indurre una forte destabilizzazione delle membrane ma non è capace di formare canali stabili, indicando che la sua azione non è sulla membrana batterica. La sua potenzialità di destabilizzare la membrana potrebbe consentirgli di entrare nella cellula mediante un meccanismo a tappeto (Figura 3) (49) e successivamente esercitare la sua azione antibatterica contro un bersaglio intracellulare. L'attività antibatterica riscontrata in proteine coinvolte nella compattazione del DNA delle cellule eucariotiche evidenzia che probabilmente vi sia un loro coinvolgimento nei meccanismi di difesa dell'organismo contro gli agenti patogeni. Infatti l'istone H1 ha mostrato spesso una localizzazione esterna a quella nucleare, ad esempio nel citoplasma delle cellule di

villi intestinali dai quali è rilasciato nel lume intestinale (64), o ancora sulla superficie dei macrofagi murini dove svolge la funzione di recettore della tiroglobulina (65), ed è stato ritrovato come proteina di membrana nei neuroni murini (66) e nei monociti umani (67). Di recente è stato, inoltre osservato che gli istoni H1 e H2B estratti dai tessuti riproduttivi del pollo sono attivi sia contro batteri Gram<sup>+</sup> che Gram<sup>-</sup> e probabilmente giocano un ruolo importante nell'immunità innata (68).

La seconda fase del progetto di ricerca è stata rivolta allo studio del meccanismo d'azione di queste molecole ad attività antibatterica utilizzando come molecola modello la poly-Arg.

Le immagini a fluorescenza ottenute incubando *B.cereus* ed *E. coli* O157 con poly-Arg coniugata al DEAC,SE hanno mostrato una distribuzione della fluorescenza sulla superficie della cellula batterica ma anche all'interno di essa, come si evince dal confronto con la colorazione degli stessi batteri con DAPI che entra nelle cellule e lega il DNA.

La possibilità che poly-Arg possa entrare all'interno della cellula potrebbe suggerire che, per svolgere la sua azione, essa interagisca con un componente interno alla cellula influenzando processi vitali quali duplicazione del DNA, trascrizione e sintesi proteica. Poiché le molecole che hanno mostrato attività antibatterica hanno caratteristiche simili alla poly-Arg, in quanto sono fortemente basiche, e svolgono la funzione biologica di compattare il DNA (protammine ed istoni H1) si potrebbe supporre che il bersaglio delle molecole saggiate possa essere il DNA. Ciò potrebbe rispecchiare il comportamento di alcuni peptidi antimicrobici ricchi in prolina e arginina come l'indolicidina, isolata dai granuli citoplasmatici dei neutrofili bovini, che inibisce la sintesi del DNA (69). Per verificare se tali molecole avessero affinità per il DNA sono stati condotti saggi EMSA in presenza di DNA plasmidico e quantità crescenti delle molecole antibatteriche. Tutte le molecole analizzate hanno mostrato affinità di legame al DNA ma con efficienza e modalità diverse.

Da studi precedenti svolti dal nostro gruppo di ricerca è stato evidenziato che gli istoni H1 di origini diverse (spermatico e somatico) interagiscono con il DNA in modo diverso. L'interazione dell'istone H1 di spermi col DNA porta probabilmente alla formazione di aggregati già a rapporti istone/DNA molto bassi ai quali persiste comunque la banda di DNA a mobilità elettroforetica massima (Figura 4A). In seguito vi è una brusca transizione (rapporto istone /DNA di 100) ad uno stato in cui tutto il DNA è sottoforma di aggregato che rimane nel pozzetto del gel. Tale modalità di legame è stata da noi definito di tipo "tutto o nulla". D'altra parte, anche l'istone somatico aggrega il DNA ma quando la sua quantità relativa al DNA aumenta, il ritardo di mobilità dei campioni aumenta in modo graduale fino a quando, ad un rapporto istone/DNA di 60 si ha la formazione di grandi complessi polimerici che non penetrano nella matrice del gel; ciò suggerisce che le molecole di DNA si sono aggregate in un complesso polimerico molto grande (Figura 4B). A tale tipo di interazione è stato dato il nome di modalità "graduale". Il legame dell'istone somatico al DNA lineare mostra quindi una modesta cooperatività in accordo con Ellen and van Holde (70) mentre gli esperimenti condotti con l'istone H1 di spermi rivelano una elevata cooperatività indicata dalla distribuzione bimodale tra il DNA nudo e il DNA altamente complessato.

La cooperatività di legame dell'istone spermatico sembra essere talmente elevata da non consentire nell'ambito degli intervalli di rapporti proteina/DNA analizzati di evidenziare le bande a mobilità graduale che potrebbero essere presenti ai rapporti intermedi. Nel caso dell'istone somatico la cooperatività più lenta consentirebbe di evidenziare le bande a mobilità graduale già negli intervalli di rapporti utilizzati. Tale

comportamento potrebbe essere attribuito nel caso degli istoni al loro diverso contenuto in arginine e lisine. Infatti l'istone H1 di spermatozoi presenta un 12,6% di arginine e 25,7% di lisine, mentre l'istone H1 di C.T. l'1,8% di arginine e il 26,8% di lisine. La maggiore tendenza a formare aggregati con il DNA dell'istone spermatico rispetto al somatico potrebbe essere dovuta al maggiore contenuto in arginine del primo rispetto al secondo, in quanto è riportato che poly-Arg, a differenza di poly-Lys, è in grado di formare complessi circolari con il DNA (71). Sebbene le catene laterali basiche di entrambe lisina e arginina interagiscono in maniera elettrostatica con i fosfati del DNA, le interazioni bidentate con il gruppo guanidinico sono più specifiche e più forti rispetto a quelle che coinvolgono le catene laterali della lisina (72). Quindi un contenuto in arginine più elevato nell'istone H1 spermatico rende le interazioni istone-DNA più forti conferendo all'arginina un ruolo importante nel localizzare e rendere stabile il legame dell'istone al DNA.

Il fenomeno di alta cooperatività potrebbe quindi essere dovuto in parte ad un valore critico di arginine che come è noto dalla letteratura sono in grado formare col DNA aggregati di maggiori dimensioni rispetto a quelli formati dalla poly-lisina (71). Per la modalità di tipo graduale si potrebbe ipotizzare che essendoci principalmente lisine la cooperatività sia più bassa e quindi sarebbero evidenziabili le bande a mobilità intermedia. Tale ipotesi è avvalorata dai saggi EMSA ottenuti utilizzando i polimeri di sintesi, in quanto poly-Arg ha mostrato una modalità di legame di "tipo tutto o nulla" mentre poly-Lys una modalità di tipo graduale (Figura 31).

Tra tutte le molecole analizzate, quelle che hanno un elevato contenuto in arginine mostrano alta cooperatività nell'interagire con il DNA con modalità "tutto o nulla" ed hanno mostrato un'attività antibatterica efficace, suggerendo che probabilmente questa modalità di legame potrebbe essere critica per l'attività antibatterica. Discorso a se è rappresentato dai polimeri di sintesi che come accennato hanno diversa modalità di legame al DNA ma attività antibatterica simile e più efficiente della maggior parte delle altre molecole. Questo non sorprende per poly-Arg, poichè rispecchia quanto detto in precedenza mentre per poly-Lys sarebbe stato lecito aspettarsi una minore efficienza nell'attività antibatterica, come nel caso dell'istone H1 di C.T.. Probabilmente i polimeri di sintesi, essendo omopolimeri, non risentono della presenza di altri amminoacidi che potrebbero influenzare l'attività antibatterica, come nel caso delle altre proteine esaminate ed in particolare dell'istone H1 di C.T.. In Giappone infatti i polimeri di  $\epsilon$ -lisina sono già in uso come conservanti alimentari e quindi sono evidentemente molto attivi su un ampio range di agenti patogeni e sono anche l'unico esempio di omopolimeri con attività antimicrobica.

Nell'ambito della modalità di tipo tutto o nulla è possibile evidenziare già a bassi rapporti proteina/DNA la coesistenza sia della banda a mobilità massima sia a mobilità nulla indicando che l'affinità per il DNA della molecola in esame è molto elevata. E' questo il caso della salmina, che già ad un rapporto percentuale 10 (Figura 23) mostra un comportamento di questo tipo e per attività antibatterica è risultata tra le molecole più efficienti, mentre proteine che presentano la banda a mobilità nulla a rapporti più elevati sono leggermente meno efficienti. Se fosse quindi vera l'ipotesi che queste molecole penetrano nella cellula e hanno come bersaglio il DNA, la maggiore o minore affinità per il DNA evidenziata negli EMSA, si potrebbe tradurre, come già accennato in una maggiore o minore attività antibatterica.

Questi risultati sono in accordo con Mitchell et al. (73) che hanno dimostrato che polimeri di L- e D- arginina penetrano all'interno dei linfociti T umani meglio dei polimeri di lisina e di istidina in quanto il gruppo guanidinico potrebbe promuovere l'assorbimento cellulare più efficientemente rispetto agli altri gruppi carichi

positivamente delle catene laterali degli amminoacidi. Inoltre recentemente è stato dimostrato che alcuni peptidi ricchi in arginina e con attività antibatterica penetrano nel citoplasma della cellule batteriche (74).

Saggi EMSA condotti con i derivati deguanidinati di entrambi gli istoni H1, della protamina di *Ch.v.* e della clupeina hanno mostrato per tutti una riduzione dell'affinità al DNA, intesa come minore cooperatività nel legame rappresentata dalle bande a mobilità gradualmente ritardata (Figure 26, 27, 28, 29). La clupeina deguanidinata, invece continua a mostrare ai rapporti analizzati una modalità del tipo tutto o nulla ma non riesce a saturare il DNA per cui sarà necessario analizzare rapporti maggiori per cercare di chiarire l'effetto della modifica sull'interazione con il DNA. Il diverso comportamento in seguito a deguanidinazione, che converte le arginine in ornitine, vicarianti delle lisine, è in linea con quanto finora ipotizzato sul maggiore coinvolgimento delle lisine nell'interazione a minore cooperatività con il DNA. Da quanto sinora ipotizzato ci si aspetterebbe che l'attività antibatterica delle molecole deguanidinate risulti minore rispetto alle molecole native ma in realtà tutti i derivati deguanidinati sono risultati leggermente più efficienti delle rispettive molecole native. Ciò potrebbe essere dovuto alla presenza, come dimostrato per gli istoni H1 deguanidinati, di peptidi attivi derivati dalla frammentazione delle molecole sottoposte a deguanidinazione, responsabili dell'attività antibatterica e più efficienti delle molecole native. Tale ipotesi trova riscontro in numerosi esempi riportati in letteratura di peptidi antimicrobici che derivano da proteine non attive. Quindi sembrerebbe che la presenza di un contenuto critico in arginine possa determinare una maggiore cooperatività di legame al DNA a cui corrisponde una maggiore attività antibatterica. Un'ulteriore prova di ciò è stata ottenuta dall'analisi dell'attività antibatterica della protamina acetilata e succinilata che pur avendo ridotto quasi a zero il contenuto in lisine mostra attività antibatterica paragonabile alla molecola nativa. Tale attività sarebbe quindi del tutto attribuibile al 47% di arginine di cui è costituita la protamina. Risulta poco chiaro il comportamento di tali derivati modificati nei saggi EMSA in quanto invece di mostrare una modalità del tipo tutto o nulla, caratteristica delle molecole ricche in arginine mostrano una modalità di tipo graduale con ridotta efficienza di legame (Figura 30) dovuta probabilmente all'eccesso di gruppi chimici aggiunti durante le reazioni di modifica che hanno completamente modificato la struttura della proteina alterandone la capacità di interagire in modo altamente cooperativo con il DNA.

Il risultato ottenuto dai saggi EMSA con DNA genomico di *E.coli* in presenza di quantità crescenti di istone H1 di C.T. e di poly-Arg ha mostrato per entrambe le molecole comportamento analogo a quello riscontrato con il DNA plasmidico e nel caso di poly-Arg anche lo stesso grado di affinità per il DNA laddove l'istone H1 richiede rapporti più elevati per saturare il DNA. Tutto questo si riscontra anche nella maggiore efficienza antibatterica di poly-Arg rispetto all'istone H1 C.T.. Saranno comunque necessari ulteriori studi per cercare di chiarire meglio la relazione tra attività antibatterica e modalità di interazione con il DNA di tali molecole. D'altra parte il meccanismo d'azione delle molecole ad attività antibatterica non è del tutto chiaro. Le molecole ad attività antimicrobica sono principalmente peptidi carichi positivamente caratterizzati sia da catene laterali idrofobiche che idrofiliche che consentono loro sia di essere solubili in ambiente acquoso sia di penetrare attraverso la membrana ricca in lipidi (75). Essi potrebbero quindi passare attraverso la membrana esterna delle cellule batteriche sia per depolarizzare la membrana citoplasmatica e causare la lisi cellulare, sia passare attraverso la membrana citoplasmatica per interagire con un componente interno alla cellula (25). Al



momento è difficile chiarire il meccanismo molecolare responsabile dell'attività antibatterica di poly-Arg e delle proteine analizzate e saranno necessari ulteriori studi per definire la relazione tra struttura e funzione di queste molecole. Ciò consentirà di valutare al meglio i fattori su cui agire per migliorarne l'attività antibatterica e rendere possibile il loro impiego nella conservazione degli alimenti, naturalmente dopo averne escluso la tossicità per l'uomo.

Nello stesso tempo potrebbe aprire nuove prospettive di utilizzo in svariati campi quali ad esempio quello medico in cui si rende sempre più necessaria la scoperta di nuove molecole antimicrobiche naturali per contrastare il continuo manifestarsi della resistenza agli antibiotici da parte dei microrganismi patogeni.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Sommers C., Xueting Fan, Niemira B. and Rajkowski K. (2004) "Irradiation of ready-to-eat foods at USDA'S Eastern Regional Research Center-2003 update Radiation" *Physics and Chemistry* **71**, 509–512
- 2) Kleiner K. (2000) "I won't to kill you. Now you can see your fish isn't foul without opening the pack". *New Scientist*
- 3) Vazquez-Boland J.A., Kuhn M., Berche P., Chakraborty T., Dominguez-Bernal G., Goebel W., Gonzalez-Zorn B., Wehland J. and Kreft J. (2001) "*Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants". *Clin. Microbiol. Rev.* **14**, 584-640
- 4) Fenlon D.R. (1999) "*Listeria monocytogenes* in the natural environment". In : "*Listeria*, Listeriosis, and Food Safety" 2nd edn. (Ryser E.T. and Marth E.H., Eds.), pp. 21-37. Marcel Dekker, New York.
- 5) Kimura K., Inatsu Y. and Itoh Y. (2002). "Frequency of the insertion sequence IS4Bsu1 among *Bacillus subtilis* strains isolated from fermented soybean foods in Southeast Asia." *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**, 1994–2006.
- 6) Andersson A., Ronner U. and Granum P.E. (1995) "What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*?" *Int. J. Food Microbiol.* **28**, 145–155
- 7) Faille C., Jullien C., Fontaine F., Bellon-Fontaine M.N., Slomianny C., and Bénézech T. (2002) "Adhesion of *Bacillus* spores and *Escherichia coli* cells to inert surfaces : role of surface hydrophobicity". *Can. J. Microbiol.* **48**, 728–738.
- 8) Flint S.H., Bremer P.J., and Brooks J.D. (1997) "Biofilms in dairy manufacturing plant. Description, current concerns and methods of control". *Biofouling* **11**, 81–97
- 9) Svensson B., Eneroth A., Brendehaug J., Molin G., and Christiansson A. (2000) "Involvement of a pasteurizer in the contamination of milk by *Bacillus cereus* in a commercial dairy plant". *J. Dairy Res.* **67**, 455–460
- 10) Jullien C., Bénézech T., Carpentier B., Lebreton V., and Faille C. (2003) "Identification of surface characteristics relevant to the hygienic status of stainless steel for the food industry". *J. Food Eng.* **56**, 77–87
- 11) Peng J.S., Tsai W.C., and Chou C.C. (2002) "Inactivation and removal of *Bacillus cereus* by sanitizer and detergent". *Int. J. Food Microbiol.* **77**, 11–18
- 12) Tauveron G., Slomianni C., Henry C. and Faille C. (2006) "Variability among *Bacillus cereus* strains in spore surface properties and influence on their ability to contaminate food surface equipment". *Int. J. Food Microbiol.* **110**: 254–262
- 13) Rowan N. J., Caldow G., Gemmell C. G., and Hunter I. S. (2003) "Production of diarrheal enterotoxins and other potential virulence factors by veterinary isolates of *Bacillus* species associated with non gastrointestinal infections". *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 2372–2376
- 14) Douglas L Archer (2004) "Freezing: an underutilized food safety technology?" *Int. J. Food Microbiol.* **90**:127–138
- 15) Lund B.M. (2000) "Freezing". In: Lund, B.M., Baird Parker, T.C., Gould, G.W. (Eds.), *The Microbiological Safety and Quality of Food*, vol. I. Aspen Publishers, Gaithersburg, MD, pp. 122–145.
- 16) Raymond W. Durante (2002) "Food processors requirements met by radiation processing". *Radiation Physics and Chemistry* **63**, 289–294
- 17) Papagianni M. (2003) "Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function, and applications". *Biotechnol. Adv.* **21**, 465-99

- 18)** Hexiang Wang and Tzi Bun Ng (2002) "Isolation of liliin, a novel arginine- and glutamate-rich protein with potent antifungal and mitogenic activities from lily bulbs". *Life Sci.* **70**, 1075-1084
- 19)** Suppakul P, Miltz J, Sonneveld K and Bigger SW (2003) "Antimicrobial properties of basil and its possible application in food packaging" *J. Agric. Food Chem.* **51**, 3197-3207
- 20)** Diep D.B. and Nes I.F. (2002) "Ribosomally synthesized antibacterial peptides in Gram positive bacteria" *Curr. Drug. Targets* **3**, 107-122
- 21)** Klaenhammer T R.( 1993) "Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria". *FEMS Microbiol. Rev.***12**, 39-85
- 22)** Blond A, Cheminant M, Segalas- Milazzo I, Peduzzi J, Barthelemy M, Goulard C, Salomon R, Moreno F, Farias R and Rebuffat S (2001) "Solution structure of microcin J25, the single macrocyclic antimicrobial peptide from *E.coli*". *Eur. J. Biochem.* **268**,2124-33
- 23)** Brogden K.A.(2005) "Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?" *Nature Review (Microbiology)* **3**, 238-250
- 24)** Lai R., Liu H., Lee W.H. and Zhang Y.et al. (2002) "An anionic antimicrobial peptide from toad *Bombina maxima*" *Biochem. Biophys. Res. Commun* **295**: 796-799
- 25)** Zasloff M. (2002) "Antimicrobial peptides of multicellular organisms". *Nature* **415**: 389-96
- 26)** Nishikawa M. and Ogawa K. (2002) "Distribution of microbes producing antimicrobial epsilon- poly-L-lysine polymers in soil microflora determined by a novel method". *Appl. Environ. Microbiol.*; **68**, 3575-3581
- 27)** Szokan G., Almas M., Krizsan K., Khlafula A. R., Tyihak E. and Szende B.(1997) "Structure determination and synthesis of lysine isopeptides influencing cell proliferation". *Biopolymers* **42**: 305-318
- 28)** Broekaert W.F., Terras F.R.G., Cammue B.P.A. and Osborn R.W. (1995) "Plant defensins: novel antimicrobial peptides as component of the host defense system". *Plant Physiol.* **108**, 1353-1358
- 29)** Yoshida T and Nagasawa T. (2003) "Epsilon-poly-L-lysine: microbial production, biodegradation and application potential". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **62**, 21-26
- 30)** Nishikawa M. and Ogawa K. (2004) "Antimicrobial activity of a chelatable Poly(Arginyl- Histidine) produced by the ergot fungus *Verticillium kibiense*". *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 229-235
- 31)** Andersson E., Rydengard V., Sonesson A., Morgelin M., Bjorck L. and Schmidtchen A. (2004) "Antimicrobial activities of heparin- binding peptides". *Eur. J. Biochem.* **271**,1219-1226
- 32)** Truelstrup Hansen L., Austin J.W. and Gill T.A.(2000) "Antibacterial effect of protamine in combination with EDTA and refrigeration" *Int. J. Food Microbiol.* **66**,149-161
- 33)** Ernst W.A., Thoma-Uszynski S., Teitelbaum|| S., Ko C., Hanson D.A., Clayberger C. and Krensky A.M. (2000) "Granulysin, a T Cell Product, Kills Bacteria by Altering Membrane Permeability". *J. Immunol.* **165**, 7102-7108
- 34)** Koichi Kuwano, Noriko Tanaka, Takashi Shimizu, Kohei Nagatoshi, Shinsuke Nou, Kenji Sonomoto (2005) "Dual antibacterial mechanisms of nisin Z against Gram-positive and Gram-negative bacteria". *Int. J. Antimicrob. Agents* **26**, 396-402
- 35)** Ing-Lung Shih, Ming-Haw Shen, Yi-Tsong Van (2006) "Microbial synthesis of poly( $\epsilon$ -lysine) and its various applications" *Bioresour. Technol.* **97**, 1148-1159
- 36)** Hong S.Y., Park T.G. and Lee K.H. (2001) "The effect of charge increase on the specificity and activity of a short antimicrobial peptide". *Peptides* **22**, 1669-74

- 37)** Jolle`s P. and Jolle`s J. (1984). "What's new in lysozyme research?" Mol. Cell. Biochem. **63**, 165–189
- 38)** Abdou A.M., Higashiguchi S. , Aboueleinin A.M., Kim M., Ibrahim H.R. (2007)"Antimicrobial peptides derived from hen egg lysozyme with inhibitory effect against *Bacillus* species " Food Control **18**,173–178
- 39)** Baranti M., Thomas U.and Pellegrini A (2003) "Antibacterial activity of casein-derived peptides isolated from rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) milk". J. Dairy Res. **70**,189-197
- 40)** Pellegrini A., Hulsmeier A.J., Hunziker P. and Thomas U. (2004) "Proteolytic fragments of ovalbumin display antimicrobial activity". Biochim. Biophys. Acta **1672**, 76-85
- 41)** Hayes M., Ross R.P., Fitzgerald G.F., Hill C., and Stanton C. (2006) "Casein-Derived Antimicrobial Peptides Generated by *Lactobacillus acidophilus* DPC6026" Appl. Environ. Microbiol. **72**, 2260-2264
- 42)** Richards R.C., O'Neil D.B., Thibault P. and Ewart K.V. (2001) "Histone H1: An antimicrobial protein of Atlantic Salmon (*Salmo salar*)" Biochem. Biophys. Res. Commun.; **284**, 549-555
- 43)** Hartman P.G., Chapman G.E., Moss T. and Bradbury E.M. (1977) "Studies on the role and mode of operation of the very-lysine –rich histone H1 in eukaryote chromatin. The three structural regions of the histone H1 molecule". Eur. J. Biochem. **77**, 45-51
- 44)** Vila R., Ponte I., Collado M., Arrendo J.L.R. and Suau P. (2001) "Induction of secondary structure in a COOH-terminal peptide of histone H1 by interaction with DNA". J. Biol. Chem. **276**, 30898-30903
- 45)** Piscopo M., De Petrocellis L., Conte M., Pulcrano G., Geraci G. (2006) "On the possibility that H1 histone interaction with DNA occurs through phosphates connecting lysine and arginine side chain groups". Acta Biochim. Pol. **53**, 507-513
- 46)** Johansen C., Gill T.A. and Gram L. (1996) "Changes in the cell morphology of *Listeria Monocytogenes* and *Shewanella putrefaciens* resulting from the action of protamine". Appl. Environ. Microbiol. **62**,1058-1064
- 47)** Powers J.P.S. and Hancock R.E.W. (2003) "The relationship between peptide structure and antibacterial activity" Peptides **24**, 1681-1691
- 48)** Friedrich C.L., Moyles D., Beveridge T.J. and Hancock R.E.W. (2000) "Antibacterial action of structurally diverse cationic peptides on Gram-positive bacteria". Antimicrob. Agents Chemother. **44**,2086-92
- 49)** Shai Y. (1999) "Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non selective membrane lytic peptides". Biochim. Biophys. Acta **1462**,55-70
- 50)** Bradford M.M. (1976) "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding" Anal. Biochem. **72**, 248-254
- 51)** Carr S.A., Herlihy W.C., Biemann K. (1981) "Advances in gas chromatographic mass spectrometric protein sequencing; 1-Optimization of the derivatization chemistry" Biomed. Mass. Spectrom. **8**, 51-61
- 52)** Wang D. Wilson G.and Moore S. (1976) "Preparation of cross-linked dimers of pancreatic ribonuclease Biochemistry" **15**, 660-665
- 53)** Laemli U.K. (1970) "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4" Nature **227**, 680-685

- 54)** Reddy K.V.R., Yedery R.D. and Aranha C. (2004) "Antimicrobial peptides: premises and promises" *Int. J. Antimicrob. Agents* **24**,536-47
- 55)** Honegger A., Hughes G.J. and Wilson K.J. (1981) "Chemical modification of peptides by hydrazine" *Biochem. J.* **199**,53-9
- 56)** Truelstrup Hansen L. and Gill T. (2000) "Solubility and antimicrobial efficacy of protamine on *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* as influenced by pH" *J. Appl. Microbiol.* **88**, 1049-55.
- 57)** Potter R, Truelstrup Hansen L., Gill T.A. (2005) "Inhibition of foodborne bacteria by native and modified protamine: Importance of electrostatic interactions" *Int. J. Food. Microbiol.* **103**, 23-34
- 58)** Piscopo M., De Petrocellis L., Tomei L. and Geraci G. (1993) "Anion mediated lysine-arginine interaction" *FEBS Letters* **334**, 125-127
- 59)** Papo Niv and Yechiel Shai (2005) "A molecular Mechanism for Lipopolysaccharide protection of Gram<sup>-</sup> bacteria from antimicrobial peptides" *J. Biol. Chem.* **280**,1037-87
- 60)** Liang J.F.and Kim S.C. (1999) "Not only the nature of peptide but also the characteristics of the cell membrane determine the antimicrobial mechanism of a peptide" *J. Pept. Res.* **53**, 518-22
- 61)** Boman H.G., Agerberth B., Boman A. (1993). "Mechanisms of action on *Escherichia coli* of Cecropin P1 and PR-39, two antibacterial peptides from pig intestine" *Infect. Immun.* **61**, 2978-84
- 62)** Fernandes J. M. O., Molle G., Kemp G. D. and Smith V J. (2004) "Isolation and characterization of oncorhyncin II, a histone H1-derived antimicrobial peptide from skin secretions of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*" *Dev. Comp. Immunol.* **28**, 127-138
- 63)** Birkemo G.A., Luders T., Andersen O., Nes I.F and Nisse –Meter J. (2003) "Hipposin, a histone-derived antimicrobial peptide in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.)" *Biochim. Biophys. Acta* **1646**, 207-215
- 64)** Rose F.R., Bailet K., Keyete J.W., Chan, W.C., Greenwood D. and Mahida Y.R. (1998) "Potential role of epithelial cell-derived histone H1 proteins in innate antimicrobial defense in the human gastrointestinal tract." *Infect. Immun.* **66**, 3255-3263
- 65)** Brix K., Summa W., Lottspeich F. and Herzog V.J. (1998) "Extracellularly occurring histone H1 mediates the binding of thyroglobulin to the cell surface of mouse macrophages" *J. clin. Invest.* **102**, 283-293
- 66)** Bolton S.J.and Perry V.H. (1997) "Histone H1: A neuronal protein that binds bacterial lipopolysaccharide". *J. Neurocytol.* **26**, 823-831
- 67)** Holers V.M. and Kotzin B.L., (1985) "Human peripheral blood monocytes display surface antigens recognized by monoclonal antinuclear antibodies". *J. Clin. Invest.* **76**, 991-998
- 68)** Silphaduang U. Hincke M.T., Nys Y. and Mine Y.et al. (2006) "Antimicrobial proteins in chicken reproductive system" *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; **340**, 648-655
- 69)** Subbalakshmi C. and Sitaram N. (1998) "Mechanism of antimicrobial action of indolicidin" *FEMS Microbiol. Lett.*; **160**: 91-96
- 70)** Ellen T.P. and van Holde E. (2004) "Linker histone interaction shows divalents character with both supercoiled and linear DNA" *Biochemistry* **43**, 7867-7872
- 71)** Sadako Inoue and Motohiro Fuke (1970) " An electron microscope study of deoxyribonucleoprotamines" *Biochim. Biophys. Acta* **204**, 296-303

- 72)** Ichimura S., Mita K. and Zama M. (1982) "Essential role of arginine residues in the folding of deoxyribonucleic acid into nucleosome cores" *Biochemistry* **21**, 5329-5334
- 73)** Mitchell D.J., Kim D.T., Steinman L., Fathman C.G. and Rothbard J.B. (2000) "Polyarginine enters cell more efficiently than other polycationic homopolymers" *J. Peptide Res.* **56**, 318-325
- 74)** Rezansoff A.J., Hunter H.N., Jing W., Perk L.Y., Kim S.C. and Vogel H.J. (2005) "Interactions of the antimicrobial peptide Ac-FRWWHR-NH<sub>2</sub> with model membrane systems and bacterial cells". *J. Peptide Res.* **65**, 491-501
- 75)** Izadpanah A and Gallo RL. (2005) "Antimicrobial peptides" *J. Am. Acad. Dermatol.* **52**, 381-390

## COMUNICAZIONI A CONGRESSI

**M. CONTE**, F. ALIBERTI, G. PULCRANO, L. FUCCI, M. PISCOPO

"NEW MOLECULES WITH ANTIMICROBIAL ACTIVITY AGAINST PATHOGENIC AGENTS PRESENT IN FOODS"

**VIII CONGRESSO NAZIONALE DI BIOTECNOLOGIE, 7-9 SETTEMBRE 2005, SIENA, PAG. 74**

**M. CONTE**, F. ALIBERTI, G. PULCRANO, M. PISCOPO.

"ATTIVITÀ ANTIBATTERICA DI PROTEINE E POLIMERI DI SINTESI SULLA FLORA MICROBICA PRESENTE NEI CIBI"

**GIORNATE SCIENTIFICHE DELL'UNIVERSITÀ DI NAPOLI FEDERICO II, 27-28 MAGGIO 2005, NAPOLI, PAG. 342**

M. MANCUSO, **M. CONTE**, R. LEONARDO, G. COLELLA, M. PISCOPO, L. FUCCI.

"LIVELLI DI METILAZIONE DELLA LISINA 4 DELL'ISTONE H3 NEI CARCINOMI SQUAMOSI DEL CAVO ORALE"

**GIORNATE SCIENTIFICHE DELL'UNIVERSITÀ DI NAPOLI FEDERICO II, 27-28 MAGGIO 2005, NAPOLI, PAG. 103**

**M. CONTE**, F. DI PAOLA, L. FUCCI, M. GUIDA, F. ALIBERTI, M. PISCOPO.

"ATTIVITÀ ANTIMICROBICA DI ISTONI E PROTAMMINE SULLA FLORA PRESENTE NEI CIBI"

**ATTI DEL VI CONVEGNO FISV, 30 SETTEMBRE-3 OTTOBRE 2004, RIVA DEL GARDA (TN), PAG. 213**

F. DI PAOLA, **M. CONTE**, L. DE PETROCELLIS, G. PULCRANO, R. LEONARDO E M. PISCOPO  
"EFFECT OF CHEMICAL MODIFICATIONS OF LYS AND ARG IN DNA BINDING OF PROTAMINES AND H1 HISTONES"

**ATTI DEL VI CONVEGNO FISV, 30 SETTEMBRE-3 OTTOBRE 2004, RIVA DEL GARDA (TN), PAG. 257**

R. LEONARDO, G. PULCRANO, L. FEBBRARO, **M. CONTE**, M. BRANNO E L. FUCCI

"PLAUF, A RNA-BINDING PROTEIN: GENE STRUCTURE AND MULTIPLE TRANSCRIPTS"

**ATTI DEL VI CONVEGNO FISV, 30 SETTEMBRE-3 OTTOBRE 2004, RIVA DEL GARDA (TN), PAG. 189**

## PUBBLICAZIONI

MARINA PISCOPO, LUCIANO DE PETROCELLIS, **MARIACHIARA CONTE**, GIOVANNA PULCRANO AND GIUSEPPE GERACI

"ON THE POSSIBILITY THAT H1 HISTONE INTERACTION WITH DNA OCCURS THROUGH PHOSPHATES CONNECTING LYSINE AND ARGININE SIDE CHAIN GROUPS"

**ACTA BIOCHIMICA POLONICA (2006) 53 : 507-513**

**M. CONTE**, F. ALIBERTI, L. FUCCI, M. PISCOPO

"ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF VARIOUS CATIONIC MOLECULES ON FOODBORNE PATHOGENS"  
SUBMITTED TO **WORLD JOURNAL OF MICROBIOLOGY & BIOTECHNOLOGY**

*A color che mi son stati vicini.....*

*“Tre anni son passati ,  
anche se sembran appena cominciati,  
e in un istante ecco pronti e già stampati  
riassunto, scopo e risultati!  
Ebbene sì, il momento è ormai arrivato  
di raccontar ciò che ho imparato,  
ringraziar chi mi ha aiutato  
e ricordar ciò in cui ho creduto:  
tante splendide esperienze  
tra batteri, colonne e fluorescenze!  
Ci son stati ahimè duri momenti  
tra imprevisti e fallimenti  
che spesso importanti esperimenti  
han ridotto, in mille e più frammenti!  
Ma sono state proprio le difficoltà  
a renderlo un periodo di gran complicità!  
Dimenticare mai potrei,  
ne tantomeno lo vorrei,  
gli insegnamenti di coloro  
che han seguito il mio lavoro  
e che dei piccoli pasticci  
han risolto mille crucci:  
le Prof. Piscopo e Fucci!  
Un giorno una molecola è finita  
il giorno dopo la colonna ci dà la dipartita  
e cerca cerca tra il faceto e il serio  
chi fa la foto al mio batterio..!  
Grazie dunque per avermi preparato,  
sostenuto e soprattutto guidato  
in un progetto a tratti “improvvisato,”  
ma che in modo inaspettato  
ci ha fornito il risultato!  
In me resterà per sempre il ricordo,  
di un triennio a tutto tondo  
tra l’igiene, la chimica e l’Istone  
che di tutta la ricerca è il “Gran Timone”!  
E come non parlare di colui che,  
nonostante il suo incessante lavorar,  
tra l’assegnar tesi e l’insegnar,*



*si è dato per me un gran da far.  
 Tra le anse, le autoclavi ed i batteri  
 dell'igiene mi ha mostrato i gran sentieri  
 e se oggi una *Listeria* riconoscere sò  
 è grazie a lui, il Prof Aliberti, che sempre ringrazierò!  
 E cosa dire della grande umanità, professionalità  
 ma soprattutto disponibilità  
 di coloro che insieme a noi hanno sperato,  
 nella buona sorte del filtrato!  
 Grazie dunque ai Prof. Pavone, Lombardi e Nastri  
 che di una bella collaborazione  
 han gettato i pilastri!  
 Un ultimo pensier prima di andare...  
 Alle persone che a me son tanto care  
 e che per sempre vorrei ringraziare  
 per il loro appoggio e la loro comprensione,  
 ma soprattutto per il loro immenso amore  
 che giorno dopo giorno mi ha sempre sostenuto  
 e più d'ogn'altra cosa mi ha incoraggiato!  
 E' l'amicizia che ci ha accompagnato  
 e che per sempre ci ha ormai legato!  
 Di chiamarli per nome non v'è necessità  
 poichè ognuno in cuor suo sentir saprà  
 chi questa dedica raggiunger dovrà!  
 Di tutti i ricordi da me vissuti  
 il dottorato di certo sarà nei preferiti,  
 per l'esperienza, gli incontri e le risate  
 che per fortuna non son mai mancate...!  
 Quando un giorno a questi anni ripenserò  
 con un gran sorriso di certo lo farò!  
 Beh che dire, ora è proprio terminata  
 con queste due pagine la tesi è completa  
 resta da aggiungere l'ultima cosa  
 che più di ogni altra per me è preziosa,  
 di ringraziar è il momento perfetto  
 chi da una vita mi dà immenso affetto,  
 amore, gioia e serenità:  
 son la mia Mamma e il mio Papà!  
 Un caloroso ringraziamento a tutti i miei cari  
 quelli vicini e quelli ormai lontani,  
 e alla dolce metà del mio cuore  
 che da sempre riempie i miei giorni d'amore!*

*..... Ora che tutti ho qui ricordato  
è giunto il momento più delicato  
di chiuder per sempre questa avventura  
che spero mi guidi nella vita futura!  
Certo la rima non è stata brillante  
e spesso magari anche un po' esilarante  
ma voi tutti sapete non son certo "Petrarca"  
ma solo e soltanto un Dottor di Ricerca!!!!"*

## **On the possibility that H1 histone interaction with DNA occurs through phosphates connecting lysine and arginine side chain groups**

Marina Piscopo<sup>1✉</sup>, Luciano De Petrocellis<sup>3</sup>, Mariachiara Conte<sup>1</sup>, Giovanna Pulcrano<sup>1</sup> and Giuseppe Geraci<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Structural and Functional Biology; <sup>2</sup>Department of Biological Sciences, Section of Genetic and Molecular Biology; University of Naples Federico II, <sup>3</sup>CNR-Institute of Cybernetics "Eduardo Caianiello" Pozzuoli-Naples; ✉e-mail: [piscopo@unina.it](mailto:piscopo@unina.it)

Received: 28 June, 2006; revised: 31 August, 2006; accepted: 07 September, 2006  
available on-line: 01 October, 2006

Gel filtration and velocity of sedimentation analyses on native and on lysine- and arginine-modified forms of the annelid worm *Chaetopterus variopedatus* sperm H1 histone indicate that anion-mediated lysine–arginine interactions play a relevant role in the stabilization of the oligomeric states of the molecule. CD spectroscopy shows that phosphate anions are at least an order of magnitude more efficient than chloride as negatively charged groups connecting H1 lysines and arginines. Acetylation of lysines, although not altering grossly the H1 properties, causes a tenfold decrease of the structuring efficiency of phosphates. This suggests that DNA phosphates may be sandwiched between lysine and arginine groups of H1 histone when this molecule binds to chromatin, constituting a relevant parameter for the reciprocal stabilization of the protein and of the chromatin higher order structures.

**Keywords:** sperm H1 histone, ionic interaction, *Chaetopterus variopedatus*, protein structure, lysine, arginine

### **INTRODUCTION**

Almost all nucleosomes in the chromatin of eukaryotes contain one molecule of the linker histone H1. This type of histone is present as a complex family of related proteins with distinct species- tissue- and developmental-specificity (Khochbin, 2001). H1 histones present a tripartite structure consisting of a central globular domain flanked by highly basic N- and C-terminal tail-like domains that are largely unstructured in solution (Hartman *et al.*, 1977) but acquire a substantial amount of secondary structure upon interaction with DNA (Vila *et al.*, 2001a; 2001b). While the globular domain binds to nucleosomal DNA, the N- and C-terminal domains are regions considered to be involved in chromatin condensation through binding to the negatively charged phosphate groups of the internucleosome linker DNA (Lu & Hansen, 2003; 2004; Hendzel *et al.*, 2004). Interactions between H1 molecules bound to adjacent nucleosomes are considered to stabilize the 30 nm fiber typical of the condensed chroma-

tin structure (Zlatanova & van Holde, 1996; Ramakrishnan, 1997). To date, attempts to determine whether linker histones specifically self-interact in the absence of DNA or chromatin have led to different results from different research groups (Thomas *et al.*, 1992; Draves *et al.*, 1992; Maman *et al.*, 1994). A number of initial studies have indicated that H1 histones and their globular domains have a tendency to self-associate (Russo *et al.*, 1983; Maman *et al.*, 1994) especially when they are bound to DNA (Thomas *et al.*, 1992; Draves *et al.*, 1992). We have already reported on the occurrence of anion-mediated arginine-lysine interactions in the sperm protamine of the marine annelid worm *Chaetopterus variopedatus* and confirmed this type of unusual bond in model polyarginine and polylysine molecules (Piscopo *et al.*, 1993). We extend now the investigation on that type of interaction to the formation of higher order aggregates of *C. variopedatus* H1 histone and analyse the structuring capacity of different anions. To this aim we performed specific chemical modifications of lysines or arginines of H1 histone and analyzed

the effects of each of these modifications on the ability of the molecule to form aggregated structures. We report here the results of studies that provide further support to the existence of anion-mediated lysine-arginine interactions and open the possibility that DNA phosphates may act as connecting anions between those residues leading to the reciprocal stabilization of both H1 histone organization and higher order chromatin structures.

## MATERIALS AND METHODS

**Materials.** Chemical reagents and molecular mass marker proteins were obtained from Sigma (USA). Gel filtration media were purchased from Pharmacia (Sweden).

**Preparation of H1 histones.** *C. variopedatus* sperm H1 histone was purified as reported (De Petrocellis *et al.*, 1983). The purity of the protein was analysed by slab gel electrophoresis on 18% polyacrylamide/sodium dodecyl sulfate as described by De Petrocellis *et al.* (1980). The protein concentration was determined on the basis of the known content of two tyrosines per *C. variopedatus* sperm H1 molecule (De Petrocellis *et al.*, 1983) using  $\epsilon_{276} = 1340 \text{ cm}^{-1} (\text{mol tyrosine})^{-1} \text{ l}^{-1}$  (Giancotti *et al.*, 1981).

**Amino-acid side chain modifications.** Carbamylation of lysine  $\epsilon$ -amino groups of H1 histone was performed by overnight reaction of 1 mg protein in 0.1 mL of 6 M urea, at 30°C, with 1.5 M potassium cyanate. The mixture was then diluted with water to 1 mL and extensively dialyzed against water to remove excess reagent. Succinylated and acetylated derivatives were obtained by dissolving 1 mg of histone in 0.1 mL of water and overlaying the solution on 1 mL of (1:2, v/v) chloroform/dioxane mixture containing freshly dissolved specific anhydride (50 mg/mL and 25 mg/mL for acetic and succinic anhydride, respectively). The reaction, performed for 16 h at room temperature, occurs through the interface between the two solutions. The aqueous phase was then diluted with water to 1 mL and extensively dialyzed. Deguanidination reaction of arginines was performed in aqueous solution by addition of 1 vol. of hydrazine to 0.1 mL of 10 mg/mL of H1 histone followed by heating at 75°C as described by Carr *et al.* (1981) but the reaction time was decreased to 15 s. All products were analyzed on 18% SDS/PAGE as reported by De Petrocellis *et al.* (1980) loading about 20  $\mu\text{g}$  of protein in each slot. Unreacted protein aminogroups were titrated with 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (Wang, 1976).

**Gel filtration chromatography.** Native and modified H1 histones were gel filtered on  $0.5 \times 35$  cm Sephadex G-100 columns equilibrated and eluted with 100 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl, pH 7.2. Sam-

ples loaded in the gel filtration experiments contained 200  $\mu\text{g}$  of histone in 0.02 mL of the same buffer. Fractions of 0.1 mL were collected at a flow rate of 0.5 mL/h. Elution profiles were determined with Coomassie blue staining according to Bradford (1976).

**Velocity of sedimentation analyses.** Ultracentrifugation studies were performed on 5 mL of 5–20% sucrose gradients in the presence of 0.1 M NaCl, 10 mM Tris/HCl, pH 7.2. Gradients were centrifuged at 39000 r.p.m. for 18 h at 18°C in SW 50.1 (Beckman). The distribution of protein in the gradients was determined by UV absorption at 230 nm.

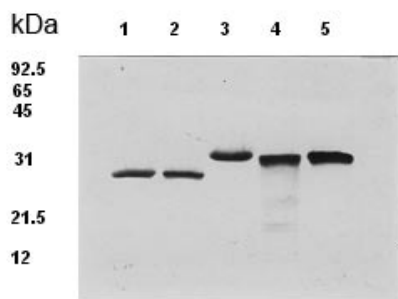
**CD spectroscopy.** CD spectra, from 260 nm to 205 nm, were recorded on a Roussel Jouan CNRS III dichrograph (Jobin Yvon) and on a Jasco J500A spectropolarimeter equipped with a DP-500N data processor. Cells with 1.0 cm light path were used and the temperature was set at  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ . Values of data points at 222 nm, reported in the figures as indicative of overall structure, derive from duplicate spectra between 260 nm and 205 nm determined on a minimum of three independent H1 histone preparations. CD spectra were determined as a function of the concentration of sodium salts of chloride, phosphate and sulfate anions. The spectra of native and of differently modified H1 histones (0.1 mg/mL) were initially determined in distilled water. Then increasing amounts of each studied salt were added directly to the H1 solution in the cuvette to study the effect of the different anions on the protein structure.

## RESULTS

The interaction of lysine aminogroups and arginine guanidino groups in the formation of H1 histone oligomeric states was studied by specific chemical modifications. Lysines were modified by carbamylation, acetylation or succinylation. Arginines were modified by deguanidination. As shown in Table 1, about 15% unreacted lysine aminogroups are present in modified H1 samples after acetylation or succinylation, 5% after carbamylation. About 20% of arginine residues remain unreacted after deguanidination with hydrazine. It is not possible to obtain better yields by hydrazinolysis because the increase of the reaction time or

**Table 1. Content of modified residues in the derivatives of *C. variopedatus* sperm H1 histone utilized in the analyses.**

Amino-acid modification	Modified residues (%)
Lysine acetylation	85
Lysine carbamylation	95
Lysine succinylation	85
Arginine deguanidination	80



**Figure 1.** SDS/PAGE analysis of *C. variopedatus* sperm H1 histone derivatives.

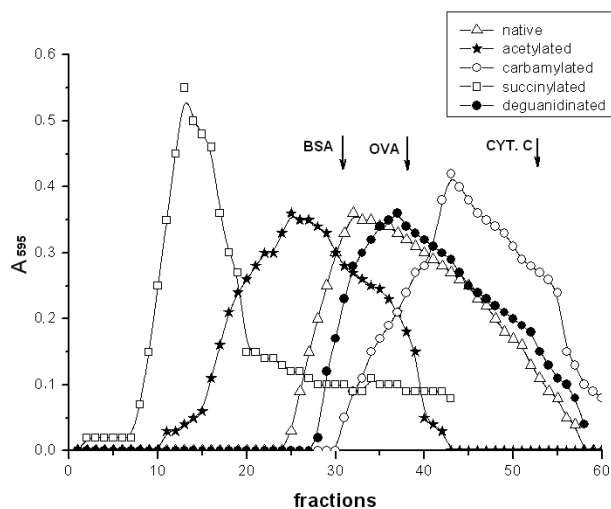
Analysis on 18% SDS/PAGE of acetylated, carbamylated, succinylated, deguanidinated and native *C. variopedatus* sperm H1 histone (lanes 1–5), respectively.

reagent concentration increases rapidly fragmentation of the molecule, already apparent, although in a minor amount, in the optimized experimental conditions used here (Fig. 1, lane 4). The gel filtration profiles of native and modified H1 molecules in the presence of 100 mM NaCl are reported in Fig. 2. The native H1 histone shows an elution peak corresponding to about 65 kDa, a value clearly higher than that corresponding to its formula mass. Succinylated H1 is eluted in the column void volume indicating the formation of stable higher aggregated forms. Carbamylated H1 histone is eluted in a volume corresponding to the molecular mass of the monomer, about 22 kDa. It is evident that the gel filtration properties of the H1 histone molecule depend on the state of its lysine residues. When guanidino groups are removed from arginines by hydrazinolysis, ornithines are formed and the charge of the molecule remains the same because of the positively charged aminogroup of ornithine. The modification, however, causes a shift of the elution peak of H1 to values corresponding to a lower molecular mass but not as low as for the carbamylated molecule. It is possible that the non-complete deguanidination of arginines may add to

the persistence of partial interactions producing a higher apparent molecular mass.

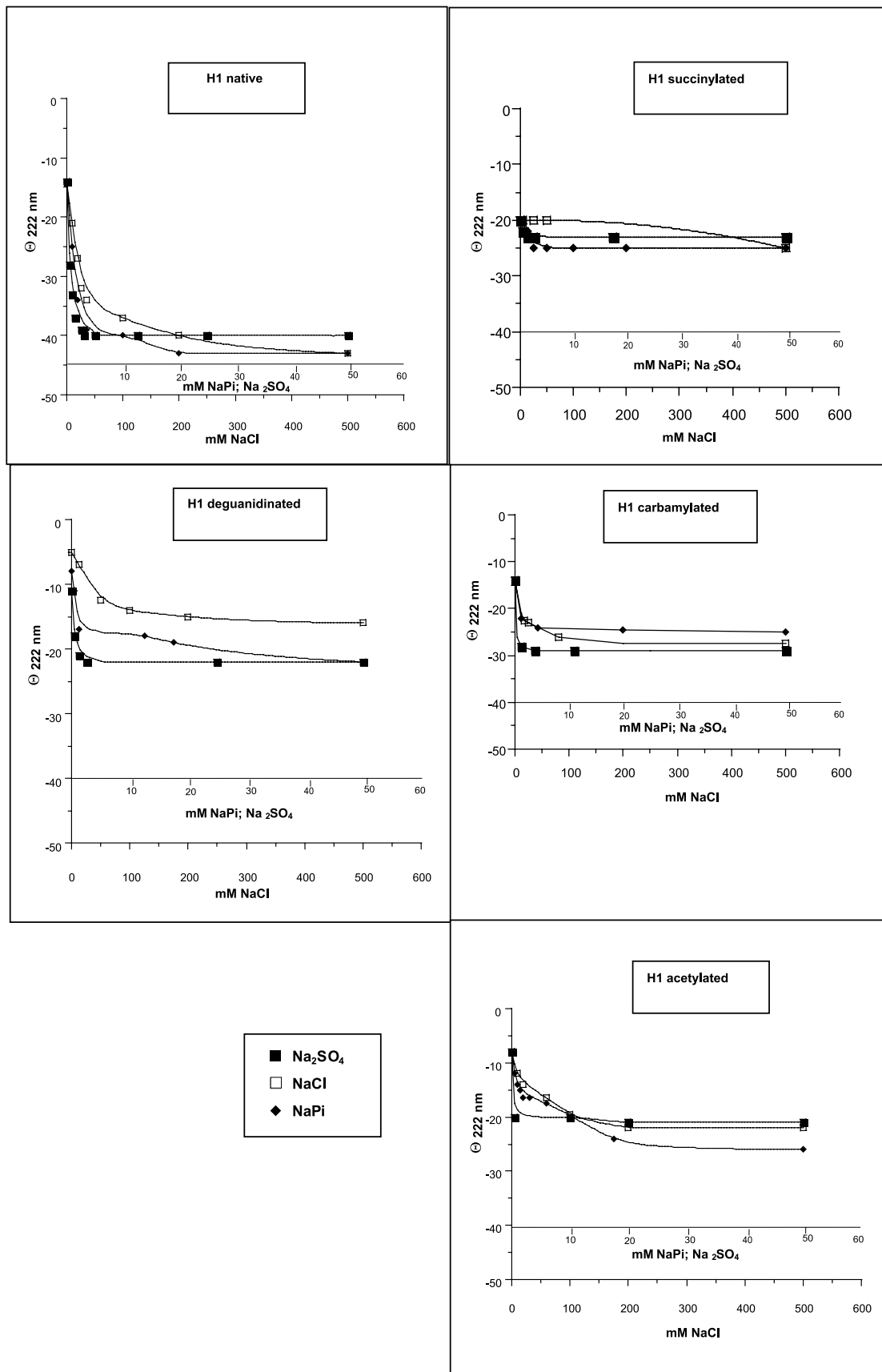
Electrophoretic analyses performed on native and modified H1 histone show the presence of only one component in all cases (Fig. 1). The observed minor differences in the mobility of the various modified forms with respect to the native molecule correlate well with the alterations in charge or molecular mass due to the chemical modifications. Deguanidination of arginines with formation of ornithines, although not altering the charge, does alter the ability of the molecule to form aggregates as shown by the gel filtration profile of the molecule (Fig. 2). This finding suggests that guanidino groups participate in the formation of oligomers of H1 and their substitution with aminogroups, as in the case of ornithines, modifies the properties of the molecule.

CD spectroscopy was used to study the influence of different ions on the structuring of native and of variously modified forms of *C. variopedatus* H1 histone. The ellipticity values at 222 nm (Fig. 3) were derived from spectra taken between 260 nm and 205 nm in the presence of increasing salt concentrations. It is evident that the modification either of the lysine amino groups or of the arginine guanidino groups of the H1 molecule result in a decreased ability of the histone to undergo structuring by salt addition. In particular, the succinylated H1 derivative shows CD spectra with  $[\theta]$  values indicating partial structuring also in the absence of added salts and the value is not influenced by salt addition. This result is in line with the observed gel filtration properties that indicate the occurrence, in this modified H1 histone molecule, of stable high molecular mass aggregates (Fig. 2). The CD spectra indicate that the H1 histone, so modified, does not appear to require any intervening anions to stabilize intra/inter molecular interactions. The carbamylated H1 molecule is the derivative showing the minimum structuring differences with respect to the native form. It appears that the amido group formed



**Figure 2.** Gel filtration profiles of native and modified *C. variopedatus* sperm H1 histone.

Gel filtration analyses performed on Sephadex G-100 column, equilibrated with 100 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl, pH 7.2. Arrows show the position of peak elution of the indicated marker proteins: BSA, bovine serum albumin (65 kDa), OVA, chicken ovalbumin (45 kDa), CYT. C, cytochrome *c* from horse heart (13 kDa).



**Figure 3. Circular dichroism spectra of native and modified *C. variopedatus* sperm H1 histone as a function of salt concentration.**

CD spectra, from 260 nm to 205 nm, determined as a function of the concentration of sodium salts of chloride ( $\text{NaCl}$ ), phosphate ( $\text{NaPi}$ ) and sulfate ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) anions.

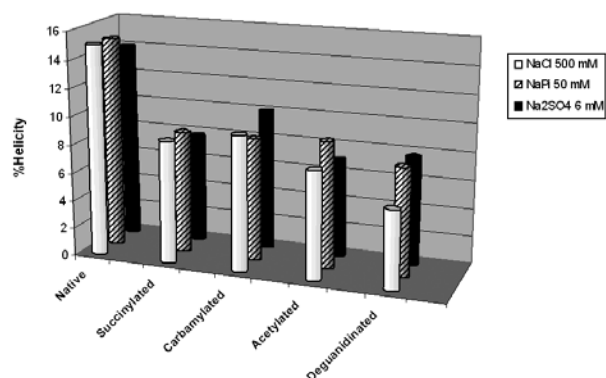


Figure 4. Helicity of native and modified *C. variopedatus* H1 histone as derived from CD spectra of the histones between 260 and 205 nm.

by lysine reaction with potassium cyanate does not alter substantially the properties of the molecule. Since the  $[\theta]$  value at 222 nm is the parameter usually taken as indicative of the overall structural organization of H1 histone molecules (Crane-Robinson *et al.*, 1976; Giancotti *et al.*, 1977; 1981; Barbero *et al.*, 1980) and of histones H4 (Wickett *et al.*, 1972) and H2B (D'Anna & Isenberg, 1972), we used a similar presentation. Assuming  $-1000^\circ$  for random coil (Moss *et al.*, 1976) and  $-30000^\circ$  for  $\alpha$  helix (Chen *et al.*, 1974), the  $[\theta]$  value at 222 nm of native *C. variopedatus* H1 histone molecule in distilled water corresponds to 15% helicity while the  $[\theta]$  values at 222 nm of H1 histone derivatives correspond to values between 6 and 10% helicity. While the limit  $[\theta]$  value, for native and modified H1 histone increases (except for the succinylated form) upon salt addition with a similar dependence for chloride ion and for ions with tetrahedral geometry, such as phosphate and sulfate, these latter ions induce the H1 helical structure at much lower concentrations than chloride (Fig. 4). The values of salt concentration that cause 50% maximum delta theta at 222 nm of native and modified H1 histone (C50%) taken as indicative of their structuring efficiency show, both for native and modified H1 histones, that sodium salts of chloride, phosphate and sulfate ions have increasing structuring effectiveness (Table 2). Velocity of sedimentation analyses on sucrose gradients (Fig. 5) demonstrate that native H1 has a sedimentation profile corresponding to a lower molecular mass value. The modified H1 forms all sediment faster than the

Table 2. Structuring efficiency of native and modified sperm *C. variopedatus* H1 histone by different anions.

H1 Derivatives	Cl <sup>-</sup>	P <sub>i</sub>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
	C50% mM		
Native	18	1.19	0.49
Acetylated	26	3	0.2
Carbamylated	12.38	0.59	0.12
Succinylated	n.d.	1.06	0.30
Deguanidinated	31.72	0.74	0.35

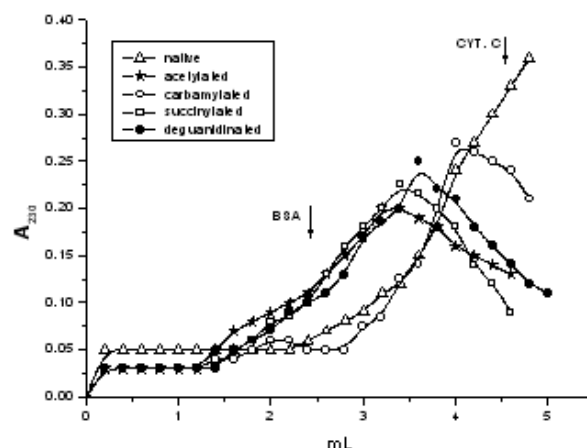


Figure 5. Sedimentation profiles on sucrose gradients of native and modified *C. variopedatus* sperm H1 histone. Analyses performed on 5–20% sucrose gradients in 100 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl, pH 7.2. Arrows show the position of the indicated marker proteins: BSA, bovine serum albumin (65 kDa) and CYT. C, cytochrome *c* from horse heart (13 kDa).

native molecule and the carbamylated derivative is the only one showing a value corresponding to that of the formula mass value.

## DISCUSSION

Native H1 histone shows the highest level of protein structuring. Modification either of the lysine amino groups or of the arginine guanidino groups results in a decreased ability of the histone to undergo structuring by salt addition. When the interaction between arginine and lysine residues is perturbed, as occurs in the variously modified derivatives in which either lysines or arginines are modified, other less specific interactions become relevant. Gel filtration analyses on the different derivatives show molecular mass values higher than the formula mass and different from the corresponding values determined by velocity of sedimentation analysis. Particularly, native H1 histone shows an elution profile of gel filtration corresponding to a tetrameric molecule while the pattern of sedimentation velocity corresponds to a molecule smaller than the monomer. These results may be due to the peculiar structure of the native H1 histone in which the central region, the limit peptide, has a globular structure and the N- and C-terminal tails are not structured, causing a gel filtration pattern inconsistent with that of velocity of sedimentation.

The dramatic differences in the properties between the native and the succinylated H1 derivative clearly indicate the critical role of the positive charges of the lysines. In the modified histone a negative group substitutes the positive lysine amino group and the molecule organization becomes independ-

ent of added ions. The very small elution volume observed by gel filtration studies is also indicative of the presence of high molecular mass aggregates. The presence of a  $[\theta]$  value at 222 nm in distilled water corresponding to about 50% of the maximum value of the native molecule and substantially invariant upon addition of ions also indicates that the modified histone has a stable intrinsic organization that does not correspond to and is not present in the native molecule. Also the velocity of sedimentation consistently indicates the occurrence of stable aggregated forms. It is noteworthy that phosphate ions are by about an order of magnitude more efficient than chloride ions in inducing H1 structuring. This, together with the reported presence on the H1 molecule of high affinity binding sites for phosphate ions (De Petrocellis *et al.*, 1986), suggests that the interaction of the H1 histone with the phosphate groups of DNA in chromatin may be an important factor not only for the stabilization of aggregated forms of H1 but also for the stabilization of the higher order structure of chromatin through the specific contribution of phosphate linking ions. Such a possibility is in line with results showing that DNA induces structuring of the H1 molecule. Our results provide an additional detail in the interaction of the phosphate groups of DNA. They suggest that interaction of DNA phosphates occurs not with one but with two specific and critical positive groups of the H1 histone. In a recent study, Lu and Hansen (2004) showed that the ability of histone H1<sup>o</sup> to stabilize chromatin folding was not evenly distributed on the molecule; rather, it was confined to two specific subdomains in the CTD. Because the distribution of the positively charged lysine and arginine side chains is very similar throughout the about 100 amino acid-long C terminus domain, binding does not correlate in a simple manner with the abundance of positively charged amino acids within that region. Those authors proposed that H1 histone initially binds to DNA largely with low specificity, probably through the globular domain. In a second step, interaction would concern positive groups of the C terminus of the protein molecule that then would acquire, as a consequence, secondary structures (Lu & Hansen, 2004). The phosphate-mediated arginine-lysine side chain interactions might then contribute to this consequential structuring of H1 histone. In agreement with this possibility, it is particularly interesting that structuring of the acetylated H1 histone derivative, in the presence of phosphate, occurs at a C50% value higher than that of native and of other modified forms of the histone (Table 2). This result indicates that this modification, which mimics the *in vivo* acetylation, is the most efficient to decrease the capacity of phosphate to structure the H1 histone molecule. Consequently acetylation is the most efficient

modification to destabilize the higher order chromatin folding and induce the transition from compact to open chromatin structure.

## REFERENCES

- Barbero JL, Franco L, Montero F, Moran F (1980) Structural studies on histones H1 and their trypsin-resistant cores from calf thymus and from histones H1. Circular dichroism and difference spectroscopy of the fruit fly *Ceratitis capitata*. *Biochemistry* **19**: 4080–4087.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248–254.
- Carr SA, Harlihy WC, Biemann K (1981) Advances in gas chromatographic mass spectrometric protein sequencing. Optimization of the derivatization chemistry. *Biomass Spectrom* **8**: 51–61.
- Chen YH, Yang JT, Chau KH (1974) Determination of the helix and beta form of proteins in aqueous solution by circular dichroism. *Biochemistry* **13**: 3350–3359.
- Crane-Robinson C, Dancy SE, Bradbury EM, Garel A, Kovacs AM, Champagne M, Daune M (1976) Structural studies of chicken erythrocyte histone H5. *Eur J Biochem* **67**: 379–388.
- D'Anna JA, Isenberg I (1972) Fluorescence anisotropy and circular dichroism study of conformational changes in histone IIb2. *Biochemistry* **11**: 4017–4025.
- De Petrocellis B, De Petrocellis L, Lancieri M, Geraci G (1980) Species specificity and individual variability of sea urchin sperm H2B histones. *Cell Differ* **9**: 195–202.
- De Petrocellis B, Parente A, Tomei L, Geraci G (1983) An H1 histone and a protamine molecule organize the sperm chromatin of the marine worm *C. variopedatus*. *Cell Differ* **12**: 129–135.
- De Petrocellis L, Quagliarotti G, Tomei L, Geraci G (1986) Structuring of H1 histone. Evidence of high-affinity binding sites for phosphate ions. *Eur J Biochem* **156**: 143–148.
- Draves PH, Lowary PT, Widom J (1992) Co-operative binding of the globular domain of histone H5 to DNA. *Mol Biol* **225**: 1105–1121.
- Giancotti V, Fonda M, Crane-Robinson C (1977) Tyrosine fluorescence of two tryptophan-free proteins: histones H1 and H5. *Biophys Chem* **6**: 379–383.
- Giancotti V, Cosimi S, Cary PD, Crane-Robinson C, Geraci G (1981) Preparation and characterization of histone H1 from the sperm of the sea-urchin *Sphaerechinus granularis*. *Biochem J* **195**: 171–176.
- Hartman PG, Chapman GE, Moss T, Bradbury EM (1977) Studies on the role and mode of operation of the very-lysine-rich histone H1 in eukaryote chromatin. The three structural regions of the histone H1 molecule. *Eur J Biochem* **77**: 45–51.
- Hendzel MJ, Lever MA, Crawford E, Th'ng JP (2004) The C-terminal domain is the primary determinant of histone H1 binding to chromatin *in vivo*. *J Biol Chem* **279**: 20028–20034.
- Khochbin S (2001) Histone H1 diversity: bridging regulatory signals to linker histone function. *Gene* **271**: 1–12.
- Lu X, Hansen JC (2003) Revisiting the structure and functions of the linker histone C-terminal tail domain. *Biochem Cell Biol* **81**: 173–176.
- Lu X, Hansen JC (2004) Identification of specific functional subdomains within the linker histone H1<sup>o</sup> C-terminal domain. *J Biol Chem* **279**: 8701–8707.



- Maman JD, Yager TD, Allan J (1994) Self-association of the globular domain of histone H5. *Biochemistry* **33**: 1300–1310.
- Moss T, Cary PD, Abercrombie BD, Crane-Robinson C, Bradbury EM (1976) A pH-dependent interaction between histones H2A and H2B involving secondary and tertiary folding. *Eur J Biochem* **71**: 337–350.
- Piscopo M, Tomei L, De Petrocellis L, Geraci G (1993) Anion-mediated lysine-arginine interaction. Evidence in *Chaetopterus variopedatus* sperm protamine. *FEBS Lett* **334**: 125–127.
- Ramakrishnan V (1997) Histone H1 and chromatin higher-order structure. *Crit Rev Eukaryot Gene Exp* **7**: 215–230.
- Russo E, Giancotti V, Crane-Robinson C, Geraci G (1983) Histone H1 and chromatin higher order structure. Does histone H1 exhibit specific self-association? *Int J Biochem* **15**: 487–493.
- Thomas JO, Rees C, Finch JT (1992) Cooperative binding of the globular domains of histones H1 and H5 to DNA. *Nucleic Acids Res* **20**: 187–194.
- Vila R, Ponte I, Collado M, Arrondo JLR, Suau P (2001a) Induction of secondary structure in a COOH-terminal peptide of histone H1 by interaction with the DNA. *J Biol Chem* **276**: 30898–30903.
- Vila R, Ponte I, Collado M, Arrondo JLR, Jiménez MA, Rico M, Suau P (2001b) DNA-induced-helical structure in the N-terminal domain of histone H1. *J Biol Chem* **276**: 46429–46435.
- Wang D (1976) Preparation of cross-linked dimers of pancreatic ribonuclease. *Biochemistry* **15**: 660–665.
- Wickett RR, Li HJ, Isenberg I (1972) Salt effects on histone IV conformation. *Biochemistry* **11**: 2952–2957.
- Zlatanova J, van Holde K (1996) The linker histones and chromatin structure: new twists. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **52**: 217–259.